UNIVERSITÉ DE STRASBOURG — FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1967-1968 — N° 851

Recherches sur le transfert de nucléotides et de R. N. A. au niveau de la membrane nucléaire

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le Juillet 1968

devant la

FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention : PHARMACIE)

par

SIMONE SIMLER - DREYFUS

Pharmacien
Attachée de Recherches à l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

---

Examinateurs de la Thèse :

MM. Pierre METAIS, Professeur, Président
Guy DIRHEIMER, Professeur
Jean-Claude STOCLET, Professeur
Paul MANDEL, Professeur

Juges

1968

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1967-1968 N° 851

Recherches sur le transfert de nucléotides et de R. N. A. au niveau de la membrane nucléaire

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le Juillet 1968

devant la

FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention : PHARMACIE)

par

SIMONE SIMLER - DREYFUS

Pharmacien
Attachée de Recherches à l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

---

Examinateurs de la Thèse { MM. Pierre METAIS, Professeur, Président
Guy DIRHEIMER, Professeur
Jean-Claude STOCLET, Professeur
Paul MANDEL, Professeur } Juges

1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A LA MEMOIRE DE MA MERE

A MON PERE

En témoignage de ma profonde affection
et de ma reconnaissance.

A MON MARI

Pour sa patience.

A MON FRERE, A MA FAMILLE.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547012_0014

A NOTRE MAITRE

MONSIEUR LE PROFESSEUR MANDEL,

qui nous a accueillie avec bienveillance, a su nous conseiller et nous diriger dès notre arrivée dans son laboratoire. Nous avons été touchée par ses profondes qualités humaines et sa constante sollicitude pour nos travaux de recherche. Qu'il trouve ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

FACULTE DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Doyen : M. M.HASSELMANN.

Doyen Honoraire : M. P.DUQUENOIS.

Assesseur : M. J.SCHREIBER

Professeurs :

MM.	R. SARTORY	Bactériologie et Cryptogamie
	P. CORDIER	Pharmacie chimique
	P. DUQUENOIS	Matière médicale et Hydrologie
	P. JAEGER	Botanique
	G. GAZET DU CHATELIER	Pharmacie galénique
	M. HASSELMANN	Chimie analytique
	J. SCHREIBER	Chimie organique
	P. METAIS	Chimie Biologique
	G. LAUSTRIAT	Physique et Mathématiques
	J.C. STOCLET	Pharmacodynamie

Professeurs Honoraires : MM. C.LAPP - J.P.EBEL.

Professeurs sans chaire :

MM.	A. LEDOUX	Zoologie
	J. MALGRAS	Hygiène
	G. DIRHEIMER	Sciences Appliquées

Maîtres de Conférences :

MM.	C.F. LAPP	Sciences physico-chimiques
	L. JUNG	Physique
	C. MATHIS	Pharmacie galénique
	A. STAHL	Biochimie pharmaceut. et techn.

Maître de Conférences honoraire : M. E.COLLARD

Cours complémentaire :

Mme	HUET-WEILLER	Législation et Déontologie pharm.

Chefs de travaux pratiques :

Mme	M. KRISTENSEN-REH	Chimie
Mme	N. OURISSON-HEILIGENSTEIN	Physiologie Végétale
M.	C. ROMOND	Bactériologie
M.	P. LAUGEL	Chimie
Mme	D. WENCKER-SCHAELDERLE	Physique et Mathématiques
M.	C.G. WERMUTH	Chimie
Mlle	C. ASSENMACHER	Chimie
Mlle	M. MEYLAENDER	Essais de médicaments végétaux
M.	G. STEINECKER	Pharmacie galénique et Zoologie
M.	H. LAMI	(délégué dans les fonctions) Physique
M.	J.P. SCHREIBER	(- - - -) Physique
M.	Y. CHAMBRON	(- - - -) Chimie Biol.
M.	B. HORB	(- - - -) Parasitologie et Histologie

A V A N T - P R O P O S

A la suite des travaux de Monsieur M. REVEL, avec lequel nous avons eu la chance de collaborer dès 1961, nous avons poursuivie les recherches concernant le transfert des nucléotides et des RNA à travers la membrane nucléaire. Nous avons pu apprécier à son contact son enthousiasme et ses profondes connaissances.

Nous tenons à remercier Messieurs les Professeurs METAIS, DIRHEIMER et STOCLET de nous avoir fait l'honneur d'accepter et de juger notre travail.

Les échanges de vue avec Monsieur P. CHAMBON et Mademoiselle M. JACOB, nous ont été très utiles et nous les en remercions sincèrement.

Nous exprimons nos sincères remerciements à Messieurs G. VINCENDON, J. KEMPF et A. WAKSMAN pour leurs conseils éclairés. Qu'il nous soit permis d'exprimer ici notre plus vive reconnaissance à Mademoiselle M. WINTZERITH pour la constance et la qualité de ses conseils ainsi que pour sa gentillesse. Nous avons eu la chance de pouvoir travailler en collaboration avec Monsieur D. POPOVIC au cours de son séjour à l'Institut. Nous avons apprécié son esprit critique, son ardeur au travail ainsi que son amitié.

Les travaux de microscopie électronique ont pu être menés à bien grâce aux services compétents de Monsieur ZAHND,

au laboratoire et de Monsieur FRANCK de l'Institut Dentaire.

Nous exprimons notre reconnaissance amicale à Madame S. SCOATARIU et à Madame D. SAYA qui, lors de leur passage, ont contribué à ce travail.

Nos remerciements vont avant tout à Monsieur J.M.GIRARDOT, ainsi qu'à Madame H. RANDRIANARISOA qui est devenue notre collaboratrice ; leur parfaite assistance technique et leur esprit de coopération quotidienne nous ont permis de terminer ce travail.

Que Madamoiselle V. TROEGER trouve ici l'expression de notre gratitude pour son dévouement et sa collaboration dans les travaux de dactylographie. Nos remerciements vont également à Mademoiselle C. COURBON qui nous a aimablement prêté son concours.

Nous exprimons notre reconnaissance à Messieurs BURTSCHELL, FRITSCH, LANDMANN, REYMANN et TAUBERT pour leur contribution précieuse à la réalisation de nombreux problèmes d'ordre technique.

Que toutes les personnes de l'Institut de Chimie Biologique et du Centre de Neurochimie de Strasbourg trouvent ici l'expression de notre amicale pensée.

T A B L E D E S M A T I E R E S

page :

INTRODUCTION

Chapitre 1 : METHODES.

I. ANIMAUX D'EXPERIENCE 6

II. RADIOISOTOPES UTILISES..... 7

III. PRELEVEMENT DES DIFFERENTS TISSUS 9

IV. FRACTIONNEMENTS CELLULAIRE ET SUBCELLULAIRE ET METHODES D'INCUBATION 9

A. Etudes sur les noyaux isolés 9

1) Préparation des noyaux cellulaires..... 9

- Préparation des noyaux selon la méthode de CHAUVEAU 11

- Préparation des noyaux selon les méthodes combinées de CHAUVEAU et de ZALTA 13

2) Incubation des noyaux 14

3) Isolement d'une fraction diffusible après incubation des noyaux dans le milieu de Logan. 15

B. Techniques physico-chimiques de fractionnement subcellulaire..... 15

1) Isolement des particules ribonucléoprotéiques cytoplasmiques 15

2) Isolement des particules ribonucléoprotéiques périnucléaires 16

3) Ultracentrifugation des particules ribonucléoprotéiques en gradient de saccharose..... 17

page :

V. DOSAGES BIOCHIMIQUES 18

A. Dosages des acides nucléiques 18

1) Isolement 18

2) Dosages des RNA et DNA 20

3) Techniques analytiques 20

a) Mesure de l'absorption dans l'ultraviolet... 20

b) Détermination de la radioactivité 20

c) Détermination de la composition en bases des acides nucléiques 21

B. Techniques physico-chimiques de fractionnement des acides ribonucléiques 22

1) Extraction des acides ribonucléiques 22

2) Ultracentrifugation en gradient de saccharose. 23

C. Séparation des nucléotides libres 23

1) Préparation de l'extrait 23

2) Chromatographie sur colonne des nucléotides libres 23

3) Détermination enzymatique du nicotinamide-adénine-dinucléotide 25

Chapitre 2 : POOL DES NUCLEOTIDES DU NOYAU CELLULAIRE. 27

I. INTRODUCTION..... 27

II. ORIGINE DES NUCLEOSIDES TRIPHOSPHATES NECESSAIRES AUX BIOSYNTHESES REALISEES DANS LE NOYAU 28

1) Le noyau synthétiserait ses propres nucléotides en vue de la biosynthèse du RNA..... 28

page :

2) Etude du transfert des nucléotides à travers la membrane nucléaire 31

a) Rappel de notions bibliographiques sur la biosynthèse de nicotinamido -adénine dinucléotide in vivo et in vitro..... 33

b) Biosynthèse de nicotinamide-adénine dinucléotide par des noyaux cellulaires incubés in vitro..... 35

c) Etude du transfert des nucléotides en vue d'une biosynthèse de nicotinamide-adénine dinucléotide 37

Chapitre 3 : TRANSFERT DES PARTICULES RIBONUCLEOPROTEIQUES ET DES ACIDES RIBONUCLEOPROTEIQUES DU NOYAU AU CYTOPLASME.

I. ACTIONS DES IONS MAGNESIUM SUR LE PASSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES DU NOYAU DANS LE MILIEU EXTRANUCLEAIRE IN VITRO 43

II. BIOSYNTHESE DES ACIDES NUCLEIQUES DANS LES NOYAUX CELLULAIRES ET TRANSFERT DES DIVERS TYPES D'ACIDES RIBONUCLEIQUES DANS LE MILIEU EXTERIEUR..... 51

A. Diffusion des RNA nucléaires après incorporation in vitro de précurseurs radioactifs des acides nucléiques 52

1) Action de l'EDTA sur les particules ribonucléoprotéiques du milieu extranucléaire 52

2) Incorporation de $^{32}PO_4^{\equiv}$ en présence d'actinomycine dans les noyaux incubés in vitro..... 55

B. Etude de la diffusion des RNA nucléaires après incorporation in vivo de précurseurs marqués des acides nucléiques 57

a) Préparation des noyaux cellulaires et isolement des fractions cytoplasmiques, périnucléaires et nucléaires 57

b) Analyse de la sédimentation des particules ribonucléoprotéiques cytoplasmiques, périnucléaires et nucléaires..... 59

c) Etude de la sédimentation des acides ribonucléiques extraits des particules ribonucléoprotéiques cytoplasmiques, périnucléaires et nucléaires en gradient de saccharose..... 65

C. Analyse de la composition centésimale en nucléotides des RNA des fractions ribonucléoprotéiques périnucléaires et nucléaires..... 68

D. Incorporation de leucine ^{14}C dans les protéines des particules ribonucléoprotéiques cytoplasmiques, périnucléaires et nucléaires..... 71

CONCLUSIONS 73

BIBLIOGRAPHIE

ABREVIATIONS

AA	:	Acides Aminés
AN	:	Acides Nucléiques
AMP	:	Adénosine Monophosphate
ADP	:	Adénosine Diphosphate
ATP	:	Adénosine Triphosphate
AS	:	Activité Spécifique
C	:	Cytoplasmique
CMP	:	Cytidine Monophosphate
UMP	:	Uridine Monophosphate
GMP	:	Guanosine Monophosphate
Cpm	:	Coups par minute
DNA	:	Acide Désoxyribonucléique
DO	:	Densité Optique
DOC	:	Désoxycholate de sodium
EDTA	:	Ethylène Diamine Tetra Acétate
g	:	Accélération de pesanteur
mCi	:	Millicurie
µCi	:	Microcurie
mM	:	Millimole
µM	:	Micromole
mRNA		Acide Ribonucléique Messager
N	:	Nucléaire
NaAD	:	Acide Nicotinique Adénine Dinucléotide
Nac	:	Acide Nicotinique
NAD	:	Nicotinamide Dinucléotide
NADH	:	Nicotinamide Dinucléotide réduit

Nam	:	Nicotinamide
NaMN	:	Mononucléotide de l'Acide Nicotinique
NMN	:	Nicotinamide Mononucléotide
PCA	:	Acide Perchlorique
PN	:	Périnucléaire
PP	:	Pyrophosphate
PPO	:	2-5 Diphenyloxazole
Diméthyl POPOP	:	1,4- bis (2-(5-phenyloxazolyl))-benzène
PRPP	:	Phosphoribosylpyrophosphate
PVS	:	Polyvinylsulfate
RNA	:	Acide Ribonucléique
RNase	:	Ribonucléase
rRNA	:	Acide Ribonucléique ribosomique
tRNA	:	Acide Ribonucléique de transfert
RNP	:	Ribonucléoprotéine
S	:	Constante de Sédimentation
SDS	:	Sodium Dodecylsulfate
TCA	:	Acide Trichloracétique
TRIS	:	Tampon Tris Hydroxyaminométhane - HCL
UV	:	Ultraviolet

I N T R O D U C T I O N

Le noyau cellulaire contient les déterminants génétiques du comportement cellulaire.

La cellule, qu'il s'agisse d'un organisme unicellulaire ou plus évolué, est un complexe hautement organisé dont une des tâches principales est de produire des molécules protidiques : les enzymes et les protéines de structure.

Un centre directeur où sont conservés les plans des structures primaires de toutes les protéines que l'organisme est susceptible de produire, est enfermé dans le noyau. C'est dans l'acide désoxyribonucléique (DNA) des chromosomes que sont inscrits les modèles de toutes les protéines que la cellule peut synthétiser. La partie nécessaire de cette information est transcrite dans des molécules d'acide ribonucléique messager (mRNA). Ces dernières vont quitter le noyau et pénétrer dans le cytoplasme pour y devenir les chaînes de montage et assurer l'assemblage des acides aminés (AA) en molécules protidiques et cela grâce à des structures particulières, les ribosomes, et aux adaptateurs, le RNA de transfert (tRNA), qui assurent la traduction du message inscrit dans les mRNA.

MORTON[108] a émis l'hypothèse selon laquelle le noyau exercerait le contrôle de la division cellulaire, de la croissance et de la différenciation, probablement par l'intermédiaire d'un composé ou de composés synthétises uniquement

dans le noyau, mais essentiels aux réactions cytoplasmiques. Un tel composé peut être le nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD ou DPN) ; ce coenzyme est nécessaire à un grand nombre de réactions enzymatiques et il est aussi essentiel dans les mécanismes aérobie et anaérobie d'apport d'énergie à la cellule. Une modification suffisante du taux de synthèse de nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD) par le noyau, modifierait la division cellulaire normale et la différenciation et conduirait, selon MORTON[16,108], à la croissance maligne.

D'après MORTON[107], les tissus à prolifération rapide embryonnaires ou cancéreux, synthétisent beaucoup de RNA et sont pauvres en NAD, tandis que les cellules normales ont un métabolisme de RNA plus réduit. Une relation directe entre la croissance, c'est-à-dire la synthèse de RNA, et la biosynthèse de nucléotides à pyridine dans les conditions normales et pathologiques, a pu être mise en évidence par REVEL[143].

Le rôle de l'ATP dans les relations nucléo-cytoplasmiques avait déjà été soulevé par MORTON[108]. L'interaction noyau-cytoplasme impliquerait un mécanisme de "feed-back" car la synthèse d'ATP dans le cytoplasme dépend de l'apport de NAD venant du noyau et la synthèse de NAD dans le noyau est fonction de l'apport d'ATP venant du cytoplasme.

A la suite des travaux de REVEL[144], nous avons continué à nous intéresser à ces relations nucléo-cytoplasmiques aussi bien du point de vue de la biosynthèse intranucléaire du NAD et de ribonucléotides, que du passage de nucléotides et

de macromolécules à travers la membrane nucléaire. Ces interrelations nucléo-cytoplasmiques ont déjà fait l'objet de nombreux travaux et posent le problème du passage du mRNA à travers la membrane nucléaire ainsi que de l'existence de particules ribonucléoprotéiques (RNP) comme support éventuel du mRNA au cours de ce transfert.

L'observation des noyaux de cellules hépatiques au microscope électronique a permis d'établir que l'enveloppe nucléaire était formée de deux membranes séparées par un espace périnucléaire[43]. Des pores,ouverts ou fermés par une membrene transversale,créent des communications par lesquelles des échanges nucléo-cytoplasmiques, entre autre le transport des ribosomes ou de particules analogues, peuvent s'établir[61]. La membrane nucléaire externe, continue avec le reticulum endoplasmique, permettrait le transport de ribosomes dans le cytoplasme[146]. Il est bien établi que tous les types connus de RNA des organismes supérieurs sont normalement synthétisés dans le noyau cellulaire[2,101,123,134]. C'est pourquoi les RNA doivent traverser la membrane nucléaire pour passer dans le cytoplasme et y exercer leur activité[122,125,146]. La présence et l'activité des ribosomes à l'intérieur du noyau ont été mises en évidence,par de nombreux auteurs,par des méthodes chimiques aussi bien que physico-chimiques. Selon certains auteurs, ces particules ont montré à l'examen du microscope électronique, une similitude de taille, d'organisation et de densité électronique avec celles des ribosomes cytoplasmiques[131].

Selon RISTOW et KOHLER[146], du point de vue théorique, deux types de migration nucléo-cytoplasmique sont à envisager pour le RNA : 1. une migration de molécules libres, 2. un transfert au moyen de véhicules spécifiques.

Nous avons étudié les conditions optimales que doit présenter un milieu biologique adopté au maintien des acides nucléiques à l'intérieur des noyaux au cours de l'incubation de ces derniers *in vitro*. Il nous a fallu définir les conditions de purification des noyaux pour éviter toute contamination cytoplasmique, afin de pouvoir contrôler les échanges nucléo-cytoplasmiques et affirmer une diffusion des précurseurs des particules RNP ou des particules RNP nucléaires elles-mêmes vers le milieu extranucléaire.

La purification des noyaux par traitement aux détergents nous a permis d'isoler une fraction membranaire qui semble correspondre à la membrane nucléaire externe et dont il a été également possible d'extraire des particules RNP par un traitement au désoxycholate (qui dissout les membranes) suivi d'une ultracentrifugation.

L'analyse des particules extraites de la membrane périnucléaire comparativement aux particules RNP cytoplasmiques et nucléaires, après marquage des noyaux *in vivo* et *in vitro* avec des précurseurs radioactifs des acides nucléiques, a permis de suivre au cours de cette étude les étapes de formation des ribosomes.

Il existe dans le cytoplasme des cellules animales, à côté des polysomes et monosomes, des particules plus petites

sédimentant à 60 et 40 S et contenant respectivement des RNA 18 S et 28 S[52, 59, 76, 122, 123, 124, 125]. Ces particules peuvent être considérées comme des précurseurs ribosomiques et peuvent représenter un véhicule pour le mRNA nouvellement synthétisé[59,76,92]. D'autres auteurs, tels SPIRIN[170] et NEMER[114] ont trouvé des particules contenant du RNA messager et dont la constante de sédimentation est analogue à celle des précurseurs ribosomiques. Ces particules subribosomiques combinent-elles les fonctions de vecteur du mRNA avec celles de précurseur des ribosomes ou polysomes[146]? Il était, a priori, intéressant de suivre l'évolution des particules ribosomiques et subribosomiques nucléaires, périnucléaires et cytoplasmiques après un marquage in vivo, afin de prouver l'origine nucléaire de ces particules.

Pour compléter cette étude des relations nucléo-cytoplasmiques, les RNA des particules RNP marquées in vivo ont été extraits et on en a déterminé le coefficient de sédimentation ainsi que la radioactivité. Au cours de l'étude du transfert des RNA messagers, préribosomiques ou ribosomiques, du noyau au cytoplasme, l'analyse de la composition en bases des RNA des particules RNP nucléaires, périnucléaires et cytoplasmiques, apporte des renseignements utiles.

Parallèlement à l'étude des RNA, la synthèse protéique dans les compartiments nucléaires, périnucléaires et cytoplasmiques, a été suivie par des expériences de marquage à l'aide d'un acide aminé radioactif, la leucine-^{14}C.

Chapitre 1

M E T H O D E S

I. ANIMAUX D'EXPERIENCE.

A. Choix des animaux.

Nous avons effectué toutes nos expériences sur des rats blancs de souche Wistar, élevés dans notre laboratoire. Cette souche peut être considérée comme génétiquement homogène car on opère des croisements répétés entre animaux d'une même portée de génération en génération. Nous avons essayé, dans la mesure du possible, d'opérer pour chaque nouvelle expérience sur une portée entière de même sexe, de 4 à 6 mois d'âge et d'un poids corporel variant entre 180 et 250 g.

B. Régimes alimentaires utilisés.

Tous les animaux recevaient une nourriture standard, le "ratigène" dont voici la composition :

Protides	20,9 unités
Lipides	4,2 unités
Amidon	46,2 unités
Matières minérales totales	8,0
Cellulose	4,3

On y adjoint de plus un apport vitaminique : une solution"d'hydrosol polyvitaminé"fournie par les Laboratoires ROCHE et dont la composition est la suivante :

Vit A	2500	UI
Vit B1	1	mg

Vit B2	0,75	mg
Vit B6	1	mg
Vit D2	500	UI
Pantothénol	2	mg
Vit C	25	mg
Vit E	1	mg
Nicotinamide ou Vit PP	2,5	mg

De l'eau est administrée ad libitum.

II. RADIOISOTOPES UTILISES.

A. Etudes in vivo.

Pour les études in vivo nous avons utilisé :

1) le ^{32}P-phosphate ($^{32}PO_4^{\equiv}$).

(sans entraîneur. Fourni par le C.E.A., France).

Après injection à raison de 300 µCi/100 g de poids corporel par voie intrapéritonéale, il est possible de suivre l'incorporation du précurseur dans les acides nucléiques et la biosynthèse de ces derniers.

2) l'acide orotique 6-^{14}C.

(activité spécifique : 34 mCi/mM - C.E.A., France);

Il a été administré à raison de 10 à 15 µCi/100 g de poids corporel par voie intrapéritonéale, et dans un volume de 0,2 à 0,4 ml de sérum physiologique.

L'acide orotique est un précurseur des nucléotides pyrimidiques qui entrent dans la composition des acides nucléiques. L'emploi de l'acide orotique permet de suivre le renouvellement et la biosynthèse des acides nucléiques.

3) la leucine ^{14}C.

(Activité spécifique 25 µCi/µmole - Radiochemical Center, Amersham).

Injectée par voie intrapéritonéale à raison de 50 µCi/100 g de poids corporel, elle permet de suivre la synthèse des protéines.

B. Etudes in vitro.

1) Adénosine triphosphates radioactifs.

- l'ATP ^{3}H(adénosine 5'-triphosphate-^{3}H-tétralithium) (activité spécifique 2 mCi/mM).

- l'ATP-^{14}C(adénosine 5'-triphosphate-8-^{14}C-Na_2) (activité spécifique, 21 mCi/mM).

Ces composés ont été fournis par Schwarz Bioresearch, Orangeburg, N.Y.

- l'ATP-^{32}P (adénosine 5'-triphosphate α-^{32}P) (activité spécifique 46 cpm/µµmole). Il a été synthétisé dans notre laboratoire.

2) Adénosine tritiée -adénosine ^{3}H.

(activité spécifique 5 mCi/100 µmoles - Radiochemical Center, Amersham).

3) Adénine-8-^{14}C.

(activité spécifique 40 mCi/mM - Schwarz Bioresearch, Orangeburg, N.Y.).

4) $^{32}PO_4^{\equiv}$.

Fourni par le C.E.A., France.

III. PRELEVEMENT DES DIFFERENTS TISSUS.

Après un jeûne de 12 h, les rats sont sacrifiés par décapitation. Les têtes sont immédiatement plongées dans de l'azote liquide et les cerveaux congelés sont isolés.

Les foies sont également prélevés immédiatement. Toutes les opérations ultérieures se font entre 0° et 4° C, soit dans une vitrine réfrigérée[97], soit dans un bain de glace. Les foies sont ensuite lavés avec du sérum physiologique, puis placés dans un milieu d'homogénéisation adéquat pour l'obtention des noyaux.

IV. FRACTIONNEMENTS CELLULAIRE ET SUBCELLULAIRE ET METHODES D'INCUBATION.

A. Etudes sur les noyaux isolés.

1) Préparation des noyaux cellulaires.

Le but de notre travail était d'étudier la synthèse réalisée par des noyaux isolés, incubés *in vitro* dans un milieu biologique. De ce fait, nous avons choisi une méthode de préparation des noyaux permettant d'obtenir des préparations nucléaires pures, exemptes de contaminations cytoplasmiques importantes, inaltérées et biosynthétiquement actives.

La préparation des noyaux diffère en fonction du milieu d'isolement. On distingue l'isolement des noyaux en milieu non aqueux d'une part et celui dans des milieux aqueux et salins d'autre part.

a) Isolement de noyaux dans des solvants non aqueux.

Depuis son introduction par BEHRENS[7], ce procédé a subi

de nombreuses modifications[86,164]. Cette technique a pour but de fixer les constituants solubles de la cellule à l'intérieur de leurs compartiments. L'échange de substances solubles entre le cytoplasme, le noyau et les autres compartiments est diminué,d'une part par le refroidissement rapide du tissu et par la lyophilisation, et par l'isolement des noyaux dans des solvants purement organiques d'autre part. Du point de vue théorique, cette méthode est plus adéquate, mais son application est plus complexe. Ainsi, MONTREUIL et coll.[35] ont observé une diffusion importante de la radioactivité des noyaux isolés selon cette méthode. De plus une partie des nucléoprotéines serait dénaturée et les lipides sont extraits.

b) Isolement des noyaux dans des milieux aqueux.

α) Isolement en milieu citrique.

Les premiers essais d'isolement de noyaux ont été réalisés par MIESCHER[104] en 1871 sur des cellules de pus traitées à la pepsine-HCl. L'utilisation de milieux acides date de CROSSMAN[33] avec de l'acide citrique 0,2 M. Des solutions plus diluées d'acide citrique ont été employées par la suite par STONEBURG[173] (1939), DOUNCE[40] (1943) et MIRSKY et POLLISTER[106] (1946).

Ces concentrations sont en général trop élevées pour permettre une bonne préservation de toutes les activités enzymatiques, mais la méthode est rapide et donne un taux élevé de noyaux propres.

Cependant, les noyaux isolés en milieu citrique et en

milieu non aqueux présentent de graves altérations morphologiques. C'est ainsi que le milieu de choix est constitué par les solutions de saccharose.

β) Isolement des noyaux dans des solutions aqueuses de saccharose.

HOGEBOOM et SCHNEIDER[63] ainsi que DE DUVE[41] ont employé des solutions de saccharose diluées. Avec des solutions de saccharose concentrées 2.2 M, le milieu d'homogénéisation possède une densité (d = 1,28) intermédiaire entre celle des noyaux (d = 1,40) et celle de cellules entières (1,10 - 1,25). Les solutions de saccharose concentrées conviennent parfaitement à l'isolement des noyaux et respectent leur morphologie[107] sans qu'il y ait perte de composants phosphorylés.

Dans le cas particulier de l'étude des acides nucléiques le procédé de CHAUVEAU et coll.[28] semble plus satisfaisant car il fournit des noyaux morphologiquement intacts avec une contamination cytoplasmique réduite.

Préparation des noyaux selon la méthode de CHAUVEAU.

Il est intéressant de noter que le saccharose 2,2M, employé dans la technique de CHAUVEAU[28], contient en outre un peu d'ions Ca^{++} ou Mg^{++} qui préviennent l'agrégation et l'altération mécanique des noyaux[157]. L'obtention des noyaux selon ce procédé s'opère par broyage et homogénéisation du tissu dans le saccharose à l'aide d'un apparail de Potter et Elvehjem refroidi ; l'homogénat est centrifugé pendant une heure à 40.000 g (rotor 30) dans l'ultracentrifugeuse réfrigérée Spinco L. On recueille, après centrifugation, un culot (qui

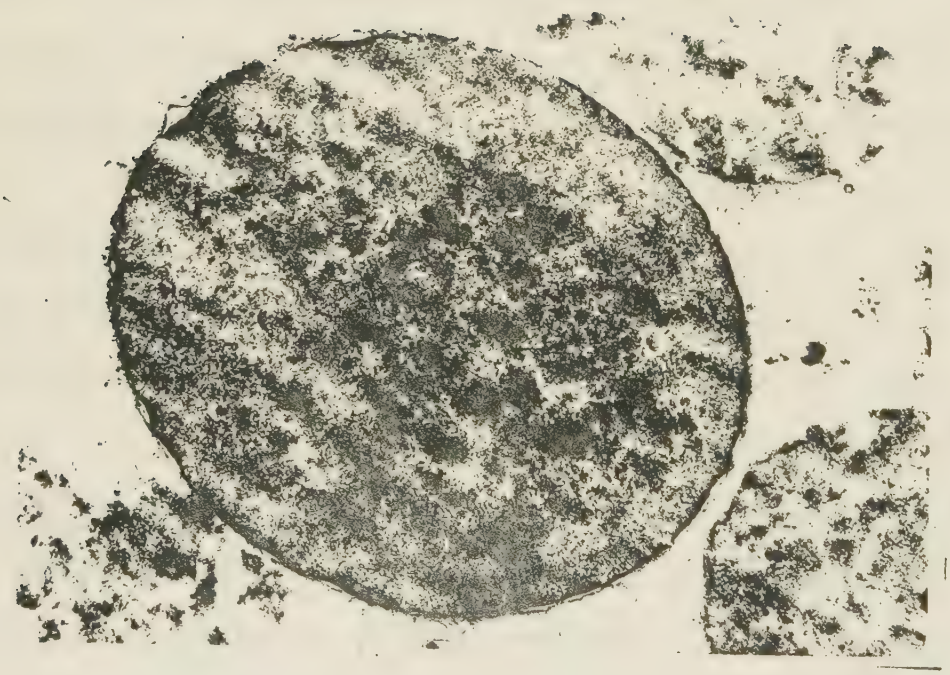


FIGURE 1 :

Examen au microscope électronique de noyaux cellulaires de foie de rat préparés selon la méthode de CHAUVEAU (X 13.950).

sera examiné au microscope à contraste de phase puis au microscope électronique) ayant l'aspect d'un gel transparent alors que les éléments cytoplasmiques se rassemblent à la surface.

L'observation des noyaux préparés selon CHAUVEAU au microscope électronique (figure 1) permet de constater que ce procédé d'isolement n'enlève pas la membrane nucléaire externe avec ses ribosomes accolés ; or, celle-ci est considérée comme une contamination cytoplasmique[12,96, 187, 188].

PENMAN et coll.[119] ont récemment démontré que la membrane nucléaire des noyaux de cellules HeLa pouvait être complètement enlevée grâce à l'emploi d'un mélange de deux détergents, le désoxycholate et le Tween 40.

L'utilisation des triton X 100 a été suggérée par BLOBEL et POTTER[12] pour éliminer des noyaux toute trace de réticulum endoplasmique. Pour notre part, nous avons adopté la méthode mise au point dans notre laboratoire[192] qui, en fait, combine les techniques au saccharose hypertonique de CHAUVEAU et coll.[28] et de ZALTA[196] aux détergents. Ce procédé d'isolement est basé sur l'emploi d'agents tensioactifs,rendant les membranes cellulaires fragiles,d'une part, et sur la dispersion du matériel cytoplasmique d'autre part. Ainsi ZALTA[196] a observé que les substances de type arylalkylphénol-polyoxyéthylène à petit nombre de molécules d'oxyde d'éthylène ont une grande affinité pour les membranes cellulaires qu'elles lysent ou rendent fragiles, ceci en fonction de la longueur de la chaîne de polyoxyde d'éthylène.

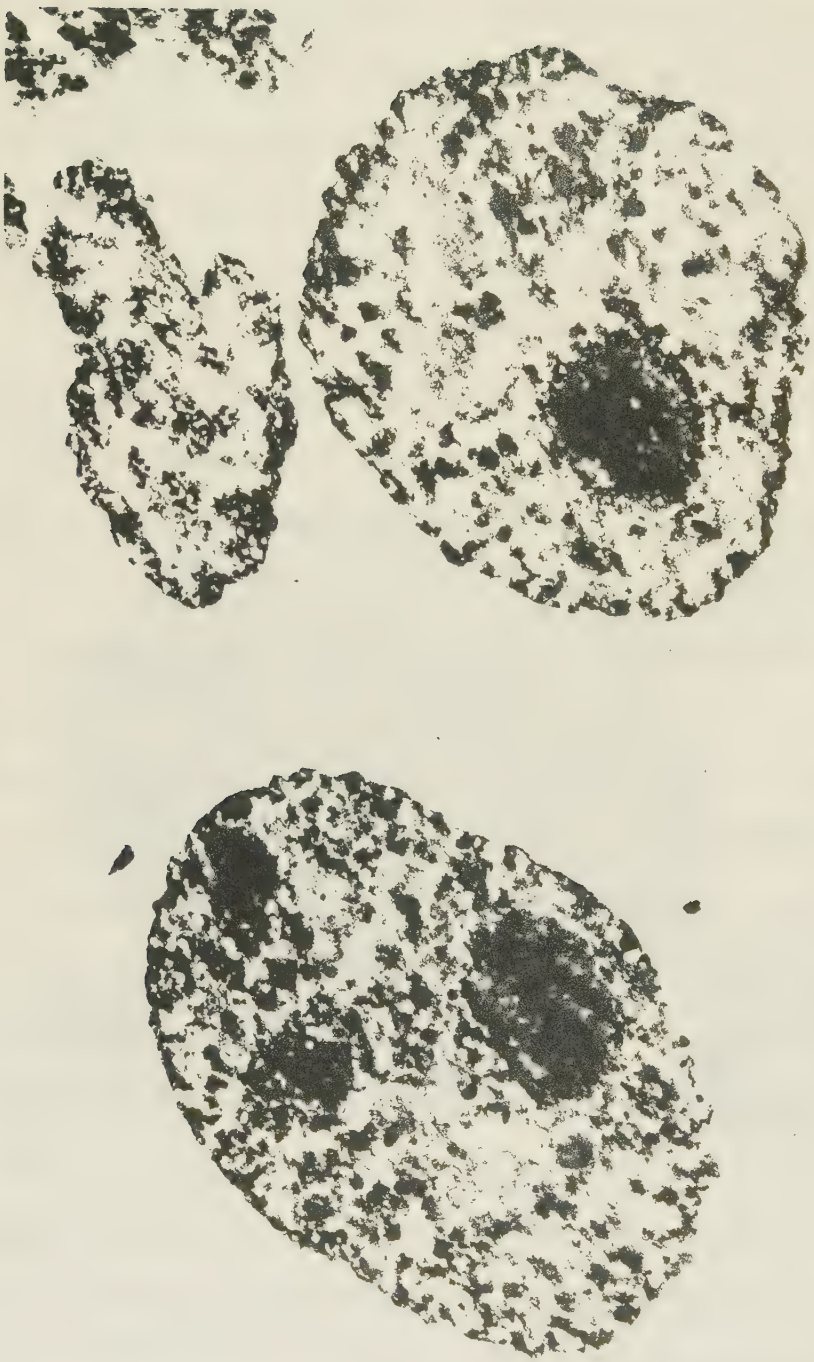


FIGURE 2 :

Examen au microscope électronique de noyaux cellulaires de foie de rat préparés selon les méthodes combinées de CHAUVEAU et de ZALTA (X 14.000).

Préparation des noyaux d'après la méthode de ZALTA.

Les foies ou les cerveaux provenant de 8 à 10 rats sont homogénéisés dans du saccharose 2,2 M. Toutes ces opérations ont lieu à 0°. Le tissu est broyé à l'aide d'un appareil de Potter et Elvehjem[152] dans 10 à 15 volumes de saccharose 2,2M contenant du $CaCl_2$, 3 mM. Après homogénéisation on ajoute 1/10ème du volume d'une émulsion à 1,5 % de nonylphénolpolyoxyéthylène à 6 moles d'oxyde d'éthylène (Cémulsol NPT_6) pour que la concentration finale soit de 0,15 % ; on laisse en contact quelques secondes puis on procède à une première centrifugation pendant une heure à 40.000 g(rotor 30) dans une ultracentrifugeuse Spinco L. Après centrifugation, on obtient une couche surnageante rouge cytoplasmique (qui servira à la prép aration des ribosomes cytoplasmiques) d'une part, et un culot de noyaux d'autre part. Les noyaux sont remis en suspension à l'aide d'un ultraturrax (type 18/2, Janke et Kunkel KG) par traitement léger et de courte durée. Chaque culot est mis en suspension dans 6 ml d'une solution de saccharose contenant 1/10ème (en volume) d'une émulsion à 1,5% de nonylphénolpolyoxyéthylène à 12 molécules d'oxyde d'éthylène (NPT 12 Cémulsol). Puis la suspension est recentrifugée dans les mêmes conditions que précédemment ; on recueille d'une part une phase en suspension vraisemblablement membranaire à partir de laquelle les particules RNP périnucléaires sont isolées et, d'autre part, un culot de noyaux qui à l'observation au microscope électronique[196] ne présente plus de traces de cytoplasme (figure 2).

2) Incubation des noyaux.

Les noyaux isolés sont repris dans du saccharose 0,25 M à raison de 15 ml de saccharose pour les noyaux provenant de 50 g de foie de rat et sont incubés à 37° pendant 15 à 30 min. sous agitation constante dans un milieu de LOGAN (pH 7,0)[90]. Ce milieu est un mélange à volume égal d'une solution A contenant 1,8 g de glucose, 625 mg de NaCl pour 100 ml d'H_2O et d'une solution B contenant 2,50 g de PO_4HNa_2, 12 H_2O, 414 mg PO_4H_2Na, H_2O, 8,55 g de saccharose, H_2O qsp.100 ml. La concentration en Mg^{++} sera précisée pour chaque série d'incubation dans les différentes expériences. Nous avons également fait varier certains constituants du milieu d'incubation et remplacé le tampon phosphate par un tampon glycylglycine pH 7,4[16].

Les incubations se font en présence d'inhibiteurs de la ribonucléase,soit le polyvinylsulfate (20 µg/ml), soit un inhibiteur préparé extemporanément à partir d'un surnageant postmitochondrial de foie de rat selon la méthode de ROTH[147].

Afin d'étudier le passage des nucléotides à travers la membrane nucléaire ainsi que le renouvellement des acides nucléiques à l'intérieur du noyau, les noyaux sont incubés en présence de précurseurs marqués tels l'adénine 8-^{14}C, l'ATP ^{14}C, l'ATP ^{3}H ou l'ATP ^{32}P ou le $^{32}PO_4^{\equiv}$.

Pour suivre la synthèse de NAD, les noyaux seront incubés en présence d'ATP (10 µmoles/2ml) et de NMN (6 µmoles/2ml). Les réactions d'incorporation sont arrêtées par refroidissement brusque à -10°C, suivi d'une centrifugation immédiate

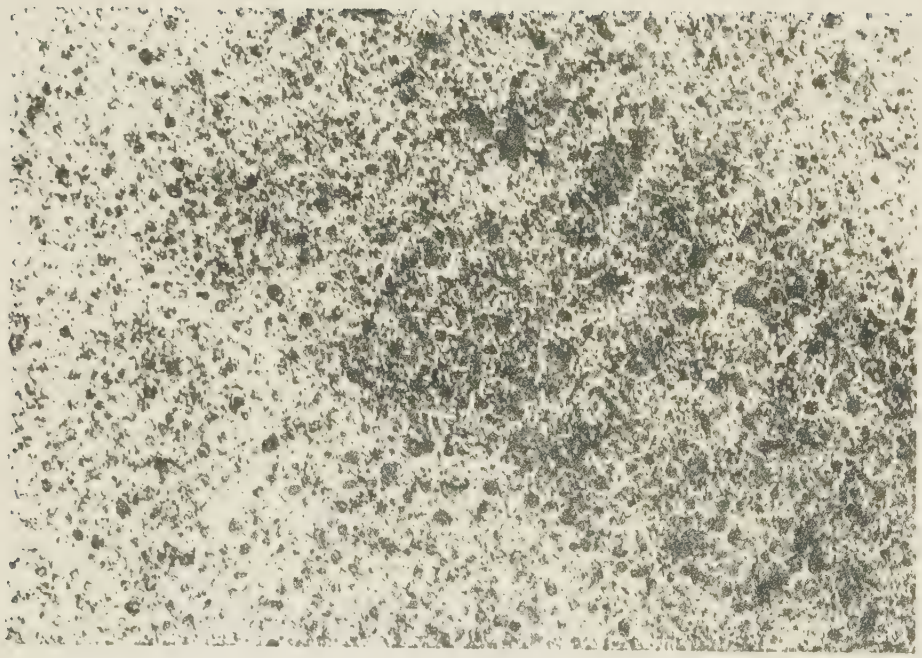


FIGURE 1 :

Observation des particules ribonucléoprotéiques nucléaires au microscope électronique (X 52.500).

à 800 tours/min. pendant 15 min. pour séparer les noyaux du milieu d'incubation.

3) Isolement d'une fraction diffusible après incubation des noyaux dans le milieu de Logan.

Le milieu d'incubation des noyaux, après séparation de ces derniers par centrifugation, est fractioné par ultra-centrifugation. Le milieu est ainsi centrifugé une première fois à 15.000 g durant 15 min. pour éliminer les débris cellulaires, puis le surnageant à une centrifugation à 105.000 g pendant 3 h ; on obtient un culot ayant un aspect gélatineux que nous avons appelé "ribosomes nucléaires". Nous avons étudié cette fraction en microscopie électronique (photo 3).

B. Techniques physico-chimiques de fractionnement subcellulaire.

1) Isolement des particules ribonucléoprotéiques cytoplasmiques.

La préparation des particules RNP cytoplasmiques a été effectuée selon la méthode de WETTSTEIN et coll.[189] de la manière suivante : la couche cytoplasmique surnageante isolée au cours de la préparation des noyaux, reprise dans 2,5 volumes de milieu M de KORNER[85] additionné de PVS, est homogénéisée à l'aide d'un homogénéiseur Potter et Elvehjem[131].

La composition du milieu M est la suivante :

Saccharose	0,25 M
Tris HCl	0,05M pH7,6
KCl	0,10 M
NaCl	0,04 M
$Mg(CH_3CO_2)^2$	0,01 M

Puis l'homogénat est centrifugé pendant 15 min. à 20.000tours/min. (Rotor 30, ultracentrifugeuse Spinco L) pour éliminer les noyaux, mitochondries et autres débris cellulaires. Le surnageant postmitochondrial est traité par agitation douce pendant 10 min., dans une vitrine réfrigérée, avec 1/9è du volume d'une solution à 5% de désoxycholate (DOC) dans un tampon Tris 0,03 M pH 8,2 préparée extemporanément. Ce traitement est effectué pour solubiliser les membranes lipoprotéiques du réticulum endoplasmique et libérer les ribosomes et polysomes. La suspension est ensuite centrifugée pendant 3 h à 105.000 g (rotor 40, Spinco L2) et on obtient un culot rosâtre translucide constitué de particules qui ont fait l'objet d'une analyse. Ces particules forment l'ensemble des ribosomes et polysomes cytoplasmiques.

2) Isolement des particules RNP périnucléaires.

La couche surnageante obtenue après le deuxième traitement des noyaux aux détergents et représentant la membrane périnucléaire avec ses ribosomes accolés, est reprise et homogénéisée dans 2,5 volumes de milieu M de Korner et traitée immédiatement au DOC,puis centrifugée à 20.000 tours/min. (rotor 30, Spinco L) pendant 15 min. pour éliminer les débris de noyaux et de membranes. On obtient un culot de particules RNP périnucléaires après centrifugation du"surnageant 20.000 tours/min." pendant 3 h à 40.000 tours/min. (rotor 40, ultracentrifugeuse Spinco L).

3) Ultracentrifugation des particules en gradient de saccharose.

a) Sédimentation des polysomes et ribosomes en gradient de saccharose. Tracé de l'absorption en ultraviolet et détermination de la radioactivité.

Les culots de particules RNP nucléaires, cytoplasmiques et périnucléaires sont mis en suspension dans 1 ml de milieu de KORNER et déposés avec soin sur des gradients linéaires 10 - 34 % de saccharose, d'un volume total de 26 ml, réalisés dans le milieu salin de Korner. Les gradients sont préparés selon la technique de BRITTEN et ROBERTS[19]. Les préparations sont ensuite centrifugées pendant 2 h 30 à 25.000 tours/min dans un rotor de type SW 25_1 à l'ultracentrifugeuse Spinco L. Après centrifugation, chaque tube est percé à l'aide d'une aiguille calibrée et l'on recueille des fractions de 10 gouttes que l'on dilue à 3 ml et dont on détermine l'absorption en UV à 260 mμ. Les coefficients de sédimentation sont déterminés selon la théorie de MARTIN et AMES[100]. Le test à l'hémosidérine sert de point de repère pour les particules sédimentant à son niveau, c'est-à-dire 65 S[110].

Le matériel acido-insoluble de chaque fraction, pour une concentration en TCA* de 10 % après addition d'une solution de sérum albumine jouant le rôle d'entraîneur, est recueilli sur des filtres de verre Whatman (5 GF/B 2,5 cm) et est lavé avec du TCA 10 % puis séché à l'alcool absolu. Quand les protéines sont marquées à la leucine ^{14}C, le matériel acido-insoluble radioactif est lavé avec une solution chaude (90°C)

de TCA 10 %. Les filtres sont ensuite introduits dans des flacons contenant du POP* et du POPOP* en solution dans du toluène. Puis les flacons sont placés dans un spectromètre Packard Tricarb, modèle 500 B. La radioactivité détectée par scintillation s'exprime en coups/min.

b) Sédimentation des particules subribosomiques 60 S et 40 S.

La méthode est identique à la précédente mais on emploie des gradients de saccharose 15 - 30 % dans un tampon RSB[185] dont la composition est la suivante :

Tris ..... 0,01 M (pH 7,4)

KCl ..... 0,01 M

$MgCl_2$ ..... 1,5 mM

Les particules sont mises en suspension dans 1 ml de RSB et déposées sur le gradient, puis sont soumises à une centrifugation de 16 h à 18.000 tours/min. dans un rotor SW 25 à la Spinco L2, selon la technique de JOKLIK et BECKER[76]. On détermine le tracé de l'absorption en UV et de la radioactivité comme pour les polysomes et ribosomes précités.

V. DOSAGES BIOCHIMIQUES.

A. Dosages des acides nucléiques.

1) Isolement.

a) Extraction des acides nucléiques.

Les acides nucléiques sont extraits après fractionnement cellulaire ou subcellulaire. Les composés acidosolubles sont éliminés par l'acide perchlorique (PCA) 0,6 N à 0°C. On

centrifuge et on procède alors à une deuxième extraction par le PCA 0,6 N. On réunit les deux surnageants acidosolubles et on dose les nucléotides libres (NAD, AMP, ADP et ATP) dans cette fraction. Le résidu acido-insoluble est lavé trois fois avec du PCA 0,6 N et 0,2 N.

b) Extraction des lipides.

Le résidu lavé est traité trois fois à l'alcool à 95 % à froid, puis à l'alcool bouillant et, enfin, par de l'éther bouillant pour extraire les lipides. Le culot délipidé renfermant les acides nucléiques (RNA et DNA) et les protéines, est séché à l'air et pesé.

c) Séparation des acides nucléiques.

La séparation des acides ribonucléiques des acides désoxyribonucléiques est basée sur le principe de la technique de SCHMIDT et THANNHAUSER[155] avec quelques modifications : le résidu délipidé et séché est hydrolysé par de la KOH N/2 à 37 ° C pendant 16 h environ. Le RNA est hydrolysé en un mélange de nucléosides 2'-3'-phosphates acidosolubles alors que le DNA et les protéines restent acido-insolubles. Après précipitation au PCA on sépare par centrifugation les ribonucléotides acidosolubles du DNA et des protéines.

La solution contenant les ribonucléotides est neutralisée par la KOH à 0°C et on laisse déposer pendant quelques heures le précipité de perchlorate de potassium. Le surnageant permettra le dosage des ribonucléotides et leur séparation par chromatographie sur colonne.

2) Dosages des RNA et DNA.

- RNA.

La détermination quantitative du RNA dans la fraction acidosoluble neutralisée de l'hydrolysat alcalin, est basée sur le dosage du ribose et sur la mesure de l'absorption dans l'ultraviolet. Le ribose est dosé selon la méthode à l'orcinol de MEJBAUM[102] reposant sur la réaction de BIAL.

- DNA.

Dans la fraction acido-insoluble de l'hydrolysat alcalin on dose le désoxyribose selon la technique de DISCHE[39] modifiée par BURTON[20].

3) Techniques analytiques.

a) Mesure de l'absorption dans l'ultraviolet.

Les bases puriques et pyrimidiques entrant dans la composition des nucléotides du RNA et du DNA absorbent dans l'ultraviolet et présentent des maxima d'absorption de 259 à 275 mμ à pH 2,0. Après dilution de la fraction acido-soluble de l'hydrolysat alcalin, on détermine l'absorption à 260 mμ à l'aide d'un spectrophotomètre ZEISS. Mais la détermination quantitative par cette méthode n'est pas rigoureusement exacte et nous ne nous en sommes servie que pour une détermination approximative, par exemple avant de déposer une fraction sur gradient de saccharose ou avant l'application sur colonne de Dowex.

b) Détermination de la radioactivité.

Après incubation *in vitro* ou injection *in vivo* de précurseurs radioactifs des acides nucléiques, nous avons suivi

leur incorporation dans les différentes fractions étudiées soit dans les particules RNP, soit dans le RNA qui les compose.

La radioactivité a été déterminée après précipitation des acides nucléiques au TCA 10 % ; les précipités obtenus sont recueillis sur filtres en fibres de verre Whatman (5 GF/B de 2,5 cm) lavés, séchés à l'alcool et introduits dans des flacons contenant un liquide de scintillation à base de POP et de POPOP dissous dans du toluène Merck ; les flacons sont placés dans un spectromètre Tricarb Packard.

c) Analyse qualitative du RNA par séparation des nucléotides sur colonne de résine échangeuse d'ions. Composition en bases des acides ribonucléiques.

La fraction acidosoluble neutralisée de l'hydrolysat alcalin (procédé de SCHMIDT et THANNHAUSER), fraction contenant les nucléotides composant le RNA, est déposée sur une colonne de verre de 7 cm de haut et de 0,6 cm; de diamètre intérieur. On adsorbe approximativement 1,5 ml de solution à analyser par ml de résine Dowex 1 X 8, 200 à 400 mailles, sous forme formiate. Après absorption, on lave abondamment la colonne à l'eau distillée jusqu'à ce que l'effluent ne présente plus d'adsorption à 260 mμ. On procède ensuite à l'élution des nucléotides par un gradient discontinu d'acide formique-formiate d'ammonium selon la technique de PETROVIC[128] comme suit :

15 ml	HCOOH	0,05 N	permettent l'élution du CMP
13 ml	HCOOH	0,5 N	---------- AMP
21 ml	HCOOH NH_4HCOO	0,05 N 0,1 M	---------- UMP
22 ml	HCOOH NH_4HCOO	0,05 N 0,2 M	---------- GMP

Après réunion de toutes les fractions correspondant à chaque nucléotide, nous avons pu établir la composition en nucléotides du RNA de départ d'après l'absorption à l'ultra-violet. Rappelons que les valeurs des rapports d'absorption à 260 mμ/280 mμ sont spécifiques pour chaque base.

B. Techniques physico-chimiques de fractionnement des acides ribonucléiques.

1) Extraction des acides ribonucléiques.

Les acides ribonucléiques ont été extraits au phénol à partir des particules RNP ainsi que du surnageant aparticulaire décrits dans le fractionnement subcellulaire.

Nous avons adopté la méthode d'extraction de KIRBY[80] légèrement modifiée. Le RNA est extrait au phénol à 0° en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) 2,5 % [8, 129]. d'hydroxyquinoléine 0,1 % et de naphtalène-disulfonate 0,1 %. Il est indispensable que la solution de phénol soit équilibrée en Tris 0,05 M (pH 7,4) et en SDS. On effectue trois extractions successives de 45 min. chacune à 0°C et les phases aqueuses sont recueillies après centrifugation pendant 15min. dans une centrifugeuse, type Jouan, à 0°, additionnées de NaCl (concentration finale 0,01 M) puis traitées par 2 volumes d'alcool à 95°, à - 20°C. On obtient un précipité floconneux de RNA. Le RNA est ensuite purifié par dissolution dans un tampon acétate 0,01 M (pH 5) NaCl 0,1 M, suivie de reprécipitation par l'alcool à -20°C. On répète ainsi trois précipitations successives puis on effectue une séparation du RNA sur gradient de saccharose.

2) Ultracentrifugation en gradient de saccharose.

Le RNA extrait et purifié est mis en suspension dans 1 ml de tampon acétate 0,01 M, ClNa 0,1 M (pH 5) puis déposé sur un gradient linéaire de saccharose 5 - 20 %, les solutions étant préalablement équilibrées en tampon acétate. On centrifuge alors pendant 16 h à 18.500 tours/min. dans un rotor de type SW 25_1 à l'ultracentrifugeuse Spinco L. Le fond des tubes est percé et l'on recueille des fractions de 10 gouttes dont on détermine l'absorption à 260 mμ au spectrophotomètre ZEISS pour obtenir le tracé d'absorption en UV. Pour le comptage de la radioactivité, on procède selon la technique déjà relatée.

C. Séparation des nucléotides libres.

1) Préparation de l'extrait.

Les nucléotides libres ont été extraits à partir de la suspension nucléaire après incubation des noyaux in vitro par traitement successif à l'acide perchlorique 0,6 N, puis 0,2 N (concentration finale). L'extrait acidosoluble est immédiatement neutralié à la potasse et le perchlorate de potassium précipité est éliminé par centrifugation puis, on lyophilise le surnageant pour le concentrer.

2) Chromatographie sur colonne des nucléotides libres.

La technique utilisée est celle de COHN[31], modifiée par HURLBERT[69] et KLETHI[81] et employée couramment dans notre laboratoire[98].

L'extrait, lyophilisé et repris dans un petit volume d'eau, est adsorbé sur résine échangeuse d'ions Dowex 1 X 8

de 200 à 400 mailles sous forme formiate. Les colonnes utilisées ont 0,8 cm de diamètre et 20 ou 30 cm de hauteur. Après adsorption sur la résine, on procède à un lavage abondant à l'eau distillée jusqu'à ce que l'effluent de la colonne ne présente plus d'absorption à 260 mμ. On procède à l'élution par des systèmes de gradients acide formique-formiate. Nous utilisons une chambre de mélange de 570 ml contenant initialement de l'eau bidistillée. La technique d'élution est la suivante :

HCOOH 0,5 N (permet l'élution consécutive des composés suivants :
nicotinamide adénine dinucléotide... NAD
cytidine monophosphate ..... CMP
adénosine monophosphate ..... AMP)

HCOOH 4 N
——— éluent——— adénosine diphosphate
NH_4HCOO 0,2 N ADP

HCOOH 4 N
——— éluent———adénosine triphosphate
NH_4HCOO 0,4 N ATP

On recueille des fractions de 3 ml et on mesure l'absorption de chaque fraction par lecture au spectrophotomètre à 260 et 280 mμ. Les données spectrophotométriques renseignent quant à la nature du nucléotide élué, compte tenu des caractéristiques spectrales des nucléotides données dans la littérature[26] d'après les travaux de BOCK[13] et de COLLOWICK[32]. Pour évaluer quantitativement les nucléotides, nous avons adopté les coefficients d'extinction moléculaire des nucléotides à 260 mμ de BOCK[13] et COLLOWICK[32].

Pour la détermination de la radioactivité des nucléotides, l'ensemble des fractions correspondant à chaque nucléotide est recueilli puis soumis à la lyophilisation et à la sublimation. Après sublimation le résidu sec a été dissout dans l'hyamine puis additionné de liquide scintillateur POP et POPOP. La lecture de radioactivité est effectuée au Tricarb Packard.

3) Détermination enzymatique du NAD.

Nous avons utilisé la technique spectrophotométrique de KAPLAN[77] ou de HOLZER[66].

On effectue le dosage enzymatique du NAD, sur une partie aliquote de l'extrait acidosoluble neutralisé à l'aide d'alcool déshydrogénase en présence d'une solution alcoolique de pyrosphosphate. Le $NADH_2$ formé est mesuré par son absorption dans l'UV à 340 mμ. Le mode opératoire est le suivant :

- la réaction est effectuée dans une solution alcoolique de pyrophosphate de Na (4,46 g $P_2O_7Na_2$, 10 H_2O + 2,9 ml d'alcool absolu H_2O Qsp 100 ml).

- On introduit dans les cubes en quartz de 1 cm de trajet optique du spectrophotomètre ZEISS : 0,5 ml d'acidosoluble neutralisé contenant le NAD + 2,5 ml de solution alcoolique de pyrophosphate. On agite et on détermine l'absorption à 340 mμ. On ajoute alors, à l'aide d'une petite spatule en verre, 0,01 ml d'alcool déshydrogénase (10 mg) mesurée à l'aide d'une micropipette et on mesure l'absorption dans l'UV à 340 mμ après agitation de 3 min. La différence entre

la première et la deuxième lecture est due à la formation de $NADH_2$. Dans nos conditions, 1 unité de densité optique correspond à 360 µg de NAD.

Chapitre 2

POOL DES NUCLEOTIDES DU NOYAU CELLULAIRE

I. INTRODUCTION.

BRACHET[15] et CASPERSSON[25] ont émis l'idée générale que le RNA était le vecteur de l'information qui part du DNA des chromosomes vers les sites de la synthèse protéique dans le cytoplasme.

On admet actuellement la nécessité d'un flot continu d'informations fournies par le DNA génique sous forme de RNA messager qui assure la synthèse protéique[57,74,169,177,178].

La synthèse des protéines nécessite le concours de trois types de RNA : le RNA messager, le RNA ribosomique de haut poids moléculaire et le RNA de transfert. Seul le RNA messager fonctionne comme vecteur de l'information et sa structure est transcrite du DNA. Ainsi, le schéma de la synthèse protéique est le suivant : le DNA dirige la formation de chaînes complémentaires de RNA messager qui reçoit l'information génétique nécessaire pour déterminer l'arrangement séquentiel des AA en chaînes polypeptidiques[18,57]. Le RNA messager s'attache lui-même aux ribosomes pour former une structure multiribosomique, le polysome[183,189]. Les AA activés sont transférés par des molécules de RNA de transfert au niveau des polysomes où le message génétique est décodé au cours du glissement du RNA messager sur les ribosomes et sur lesquels croît la chaîne polypeptidique[183,184,187,115,56]. A chaque AA correspond une molécule de tRNA spécifique qui se lie sélectivement aux sites

spécifiques du mRNA[27]. La synthèse des RNA à partir des nucléosides triphosphates est catalysée par la RNA polymérase isolée par WEISS[188] à partir des noyaux des cellules hépatiques d'une part et, d'autre part, par OCHOA et coll.[116] ainsi que par HURWITZ et coll.[70] à partir des bactéries.

Il a également été prouvé que, comme pour le RNA messager, le DNA constitue la "matrice" pour la biosynthèse du tRNA et du rRNA[55,169,194].

Ainsi, la synthèse des trois types de RNA cellulaire s'effectue selon le schéma suivant :

$$n_1ATP + n_2GTP + n_3CTP + n_4UTP$$

$$Mn^{++} \text{ ou } Mg^{++} \quad \rightleftharpoons \quad \begin{matrix} \text{RNA polymérase} \\ \text{DNA} \end{matrix}$$

$$(AMPn_1 - GMPn_2 - CMPn_3 - UMPn_4) + (n_1 + n_2 + n_3 + n_4)PP$$

Il était donc intéressant de savoir où le noyau puisait les précurseurs en l'occurence les nucléosides triphosphates nécessaires à ses synthèses et ceci posait le problème du pool des nucléotides nucléaires.

II. ORIGINE DES NUCLEOSIDES TRIPHOSPHATES NECESSAIRES AUX BIOSYNTHESES REALISEES DANS LE NOYAU.

Trois éventualités peuvent être envisagées en ce qui concerne l'origine des nucléotides nucléaires.

1) Le noyau synthétiserait ses propres nucléotides en vue de la biosynthèse du RNA.

L'aptitude bien connue des noyaux à réaliser différentes réactions, telles celles de la glycolyse et de la biosynthèse des acides nucléiques, suppose la présence de nucléotides

formées dans le noyau à partir de précurseurs synthétisés de novo ou provenant du cytoplasme. Mais, la synthèse des nucléosides triphosphates puriques à partir de ces précurseurs, nécessite pour chacun 14 réactions successives et de l'énergie fournie sous la forme d'adénosine triphosphate.

L'étude de la composition des noyaux isolés de thymus, de foie et d'autres tissus a prouvé que ces noyaux contiennent de l'ATP et d'autres nucléotides[117] en concentrations comparables à celles du cytoplasme s'ils ont été isolés dans un milieu non aqueux.

Selon MacEWEN, ALLFREY et coll.[1,94], les nucléotides nucléaires proviendraient de la phosphorylation des nucléosides ou de la formation de ribotides à partir des bases puriques ou pyrimidiques libres du cytoplasme. Deux facteurs sont en faveur d'une telle hypothèse, d'une part, de nombreux auteurs ont démontré la perméabilité de la membrane nucléaire à l'adénine et aux bases puriques et pyrimidiques, ainsi qu'aux nucléosides[1,17,90,137,138,139] ; de plus, selon LEE, les noyaux isolés de certains tissus, sont capables de réaliser une synthèse aérobie de phosphate labile[89] voire d'ATP nécessaire aux réactions de phosphorylation et de production de ribotides.

Si le passage de nucléosides et bases puriques ou pyrimidiques à travers la membrane nucléaire a pu être démontré, l'existence de la synthèse intranucléaire de novo des nucléotides est plus difficile à prouver. Bien que les noyaux isolés soient capables d'une synthèse de nucléotides limitée,il n'a pu être démontré que ces réactions fournissent suffisamment de

nucléotides au métabolisme nucléaire.

En 1957, OSAWA[117] a montré que les noyaux de thymus de veau,isolés dans un milieu contenant du saccharose 0,25 M et du $CaCl_2$ 0,003 M,pouvaient synthétiser de l'ATP par un processus aérobie différent de celui de la phosphorylation oxydative des mitochondries. De même, Mac EWEN, ALLFREY et MIRSKY[1] pensent que l'ATP des noyaux isolés de thymus de veau dériverait d'un "pool" nucléotidique endogène et que des nucléotides ajoutés ne pénètreraient pas dans les noyaux.

Le point de vue de l'équipe de MacEWEN se rapproche de celui d'autres auteurs qui ont trouvé que les noyaux du thymus du foie et du rein[9,137,138,139] peuvent accomplir la phosphorylation des substrats endogènes et synthétiser de l'ATP.

Cette formation d'ATP nucléaire ne se fait pas par le mécanisme de la phosphorylation oxydative ou par un autre mécanisme voisin car les noyaux isolés ne contiennent pas les constituants de la chaîne respiratoire tels les cytochromes ou les flavoprotéines nécessaires ; il est évident qu'il y a une formation d'ATP spéciale au noyau,appelée par certains auteurs "phosphorylation nucléaire".

Si la formation d'ATP dans le noyau provient d'une part de la glycolyse, d'autre part de la "phosphorylation nucléaire[164], il existe cependant une disproportion entre les taux de nucléotides présents dans le noyau à l'état d'équilibre et la vitesse de leur utilisation en vue de la synthèse du RNA.

Il semble également a priori peu vraisemblable que la synthèse des nucléosides triphosphates qui comporte 14 étapes

réactionnelles différentes, puisse être utilisée pour répondre aux besoins immédiats en nucléosides triphosphates au moment où s'est déclenchée la production des divers RNA.

Dans ces conditions, deux éventualités restent à envisager : soit l'apport de nucléotides se ferait à partir de formes de stockage en l'occurence des polymères pouvant libérer des nucléosides triphosphates en une ou deux étapes, soit il y aurait transfert des nucléotides du cytoplasme dans le noyau. C'est ce dernier point, le transfert des nucléotides à travers la membrane nucléaire, qui fera l'objet de notre étude.

2) Etude du transfert des nucléotides à travers la membrane nucléaire.

Le problème du passage des nucléotides du cytoplasme au noyau a donné lieu à des hypothèses contradictoires. SIEBERT[164], avait déjà postulé qu'il était difficile de déterminer si l'ATP nécessaire à la formation du nicotinamide-adénine-dinucléotide, ou à toute autre réaction, avait son origine dans le noyau, ou s'il provenait du cytoplasme. Par contre, Mac EWEN, ALLFREY et MIRSKY[1] ont observé que les nucléotides adényliques ne pénétraient pas dans les noyaux isolés de thymus de veau, car la plupart des membranes biologiques seraient imperméables aux nucléotides ; PENNIAL et coll.[121] partagent cette opinion.

Il nous a semblé utile d'examiner le problème dans des noyaux d'autres cellules animales, étant donné que les cellules du thymus sont d'un type très particulier.

Si le transfert ne semble pas impossible du point de vue histochimique, compte tenu de l'existence des pores dans la

membrane nucléaire, la démonstration non équivoque de son existence présente quelques difficultés.

En effet, pour être certain que ce transfert s'effectue, les conditions les plus simples paraissent être fournies par une incubation de noyaux isolés in vitro. Mais, seules des quantités faibles de nucléosides triphosphates peuvent être transférées dans un délai d'incubation in vitro forcément court (si l'on veut être sûr que le métabolisme nucléaire est resté indemne) ; les méthodes de dosages chimiques ne peuvent donc pas être utilisées et il faut employer des nucléotides radioactifs. Toutefois, dans ce cas, l'éventualité d'une contamination des noyaux par les nucléosides triphosphates du milieu d'incubation soulève des difficultés. En effet, pour s'assurer qu'on a éliminé tout nucléoside triphosphate radioactif adsorbé, il conviendrait de laver très soigneusement les noyaux. Or, pendant ces lavages, on risque de perdre les nucléosides triphosphates qui ont déjà pénétré dans le noyau. Pour toutes ces raisons, il nous a semblé préférable de chercher à mettre en évidence indirectement le transfert des nucléotides dans le noyau, en suivant la synthèse intranucléaire de nicotinamide adénine-dinucléotide (NAD) à partir de NMN et d'ATP, réaction catalysée par un enzyme présent uniquement dans le noyau[83,133, 64,16]. En utilisant un mélange équimoléculaire d'ATP marqué soit dans le phosphate α par le ^{32}P, soit dans la base par le ^{14}C ou le tritium et en évaluant le rapport $^{14}C/^{32}P$ ou $^{3}H/^{32}P$ dans l'ATP du milieu extérieur et dans le NAD synthétisé dans le noyau, on peut savoir si le nucléotide est passé dans le

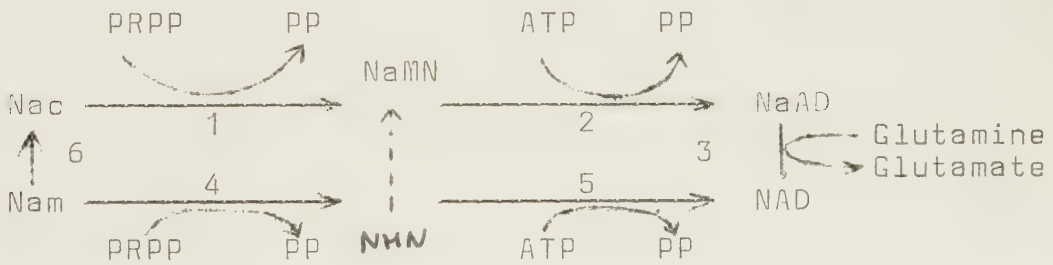
noyau "en bloc",ou s'il a subi une déphosphorylation préalable suivie de rephosphorylation. On sait, en effet, que les nucléosides traversent très rapidement les membranes[1,78,90].

Nous avons donc étudié successivement les taux de NAD synthétisés par les noyaux cellulaires et leurs mécanismes de biosynthèse susceptibles d'apporter des indications sur le transfert des nucléotides in toto.

a) Rappel de notions bibliographiques sur la biosynthèse de NAD in vivo et in vitro.

Les travaux de REVEL[142] sur les corrélations NAD-RNA effectuées à partir du même précurseur, l'adénosine triphosphate (ATP) à l'intérieur du noyau, de même que les études de WINTZERITH[98] sur la synthèse de NAD dans les cellules normales et cancéreuses, nous ont conduit à étudier la synthèse de NAD par les noyaux cellulaires de différents tissus in vitro.

Il a été établi que la biosynthèse du NAD dans les tissus animaux s'effectue à partir de deux précurseurs possibles : l'acide nicotinique et la nicotinamide[73]. MacDONALD et STEWART[93] ont résumé les voies de biosynthèse du NAD dans le schéma ci-dessous.



La biosynthèse de NAD à partir d'acide nicotinique libre décrite par PREISS et HANDLER, a montré que le mononucléotide

de l'acide nicotinique (NaMN) ainsi que l'adénine-dinucléotide de l'acide nicotinique (NaAD) étaient les intermédiaires dans cette conversion.

$$\text{Nac} + 5\ \text{PRPP} \longrightarrow \text{NaMN} + \text{PP} \quad (1)$$

$$\text{NaMN} + \text{ATP} \longleftrightarrow \text{NaAD} + \text{PP} \quad (2)$$

$$\text{NaAD} + \underset{\text{(glutamine)}}{\text{NH}_3} + \text{ATP} \longrightarrow \text{NAD} + \text{AMP} + \text{PP} \quad (3)$$

Il a été établi que la conversion de la molécule d'acide nicotinique en mononucléotide se produit préférentiellement par l'intermédiaire d'un enzyme soluble localisé en dehors du noyau ; cette molécule de NaAD précurseur devra pénétrer le noyau pour être convertie en NAD.

La biosynthèse de nucléotides à pyridine peut être provoquée par l'injection d'un précurseur, le Nam ou le NMM. Ce mécanisme a été décrit par KAPLAN et coll.[77] qui ont observé un accroissement de la concentration en NAD du foie et du cerveau après l'injection de nicotinamide à des souris par voie intrapéritonéale.

La NMN adényltransférase ou NAD pyrophosphorylase, découverte par KORNBERG[84] en 1950, qui serait strictement intranucléaire, catalyse la réaction (2).

Le nicotinamide mononucléotide, dérivé amidé du mononucléotide de l'acide nicotinique, peut également servir de subetrat à cet enzyme et il se forme alors directement du NAD[5]; cette réaction est difficile à mettre en évidence in vivo mais la formation dans le foie et la tumeur in vivo de NMN ainsi que

l'isolement et la caractérisation du NMN suggèrent fortement que la voie de synthèse par le NMN est valable[38].

b) Biosynthèse de NAD par des noyaux cellulaires incubés in vitro.

La biosynthèse nucléaire in vitro de NAD selon la réaction :

$$NMN + ATP \xrightleftharpoons{\text{NMN adényltransférase}} NAD + PP$$

nécessite plusieurs conditions et facteurs. En premier lieu, la pureté de la préparation nucléaire, un milieu d'incubation adéquat et l'adjonction à ce dernier des nucléotides indispensables à la réaction, l'ATP et le NMN. Nos résultats sont exprimés dans le tableau I.

TABLEAU I

SYNTHESE DE NAD IN VITRO PAR DES NOYAUX CELLULAIRES DE DIVERSES ORIGINES

µg P NAD/µg P DNA	Foies	Reins	Cerveaux
Sans nicotinamide mononucléotide	0	1,77	4,8
Avec nicotinamide mononucléotide	6,8	10,1	28,5
	9,2	12,0	26,5
	6,7	11,5	35,0
	8,5	14,1	27,0
	6,3	10,9	23,0

L'examen de ce tableau I montre, tout d'abord que des noyaux cellulaires isolés du cerveau contiennent encore des quantités appréciables de NAD alors que ce n'est pas le cas des noyaux du foie. D'autre part, en l'absence d'une quantité suffisante d'ATP dans le milieu extranucléaire, la synthèse de NAD n'a pas lieu. L'ATP nucléaire, formé grâce à l'énergie des phosphorylations oxydatives qui se produisent dans le noyau, est donc insuffisant pour une synthèse nucléaire appréciable de NAD. Ceci est en accord avec les travaux de REVEL[144].

D'autres auteurs ont également démontré que lorsqu'on entrave la synthèse d'ATP, la biosynthèse hépatique du NAD est inhibée Elle serait au contraire stimulée quand est stimulée la synthèse du nucléotide adénylique[93,163]. RICCI a démontré que chez le rat traité au phloridzoside (inhibiteur de la synthèse des adénylphosphates), il y a diminution de la biosynthèse de NAD après injection de Nam[145].

Parallèlement BEVILACQUA[11] a remarqué une augmentation de la biosynthèse du NAD chez des rats traités au glucose et à l'insuline. Ces conditions expérimentales déterminent une augmentation du contenu hépatique en ATP. Ainsi, l'ATP devient le facteur limitant dans la synthèse du NAD[30].

MINARD et HAHN[105] ont noté que la synthèse hépatique de NAD nécessite un apport de nicotinamide, d'adénine et de ribose.

Nous pouvons donc observer qu'il existe un parallélisme entre ce qui se passe in vivo et in vitro.

MORTON avait constaté qu'il y avait diminution des dinucléotides dans un état précancéreux avec affaiblissement de l'activité de la NMN-adényltransférase dans les noyaux d'un certain nombre de tumeurs. Ces résultats avaient suggéré le rôle possible de la NMN adényltransférase comme régulateur du taux de NAD des tissus ainsi que de la division cellulaire[108]. En résumé, nous avons relevé l'importance de l'apport des deux nucléotides NMN et ATP ainsi que de la présence de NMN adényltransférase intranucléaire au cours de la biosynthèse de NAD effectuée par des noyaux cellulaires incubés in vitro.

c) Etude du transfert des nucléotides en vue d'une biosynthèse de NAD.

Pour observer le transfert des nucléotides, nous avons étudié la cinétique de la biosynthèse de nicotinamide-adénine-dinucléotide dans les noyaux cellulaires de foie et de cerveaux de rats isolés selon la méthode combinant l'emploi de saccharose hypertonique et de détergents, décrite préalablement. Les noyaux isolés sont incubés in vitro pendant 30 min. à 37° dans un milieu de LOGAN contenant du $MgCl_2$ 0,025 M[166] en présence, d'une part d'un mélange équimoléculaire d'ATP marqué dans l'adénine par le ^{14}C ou le ^{3}H et dans le phosphate α par le $^{32}PO_4^{\equiv}$ et, d'autre part, de NMN. On sépare les nucléotides libres, NAD, AMP, ADP et ATP, par chromatographie sur colonne de Dowex échangeuse d'ions. Les quantités de nucléotides élués sont évaluées d'après l'absorption dans l'UV et, la radioactivité correspondante est mesurée, après lyophilisation, par scintillation dans un spectromètre Packard Tricarb. Les taux

TABLEAU II

SYNTHESE DE NAD PAR DES NOYAUX DE FOIE DE RAT INCUBES IN VITRO EN PRESENCE DE NMN ET D'ATP DOUBLEMENT MARQUES

Expériences	Rapport AS précurseur	Nicotinamide-adénine dinucléotide***			Adénosine monophosphate***		
	$^{14}C/^{32}P$	^{14}C	^{32}P	$^{14}C/^{32}P$	^{14}C	^{32}P	$^{14}C/^{32}P$
1*	1,2	16.400	15.000	1,1	20.800	16.100	1,28
2	1,19	470.000	340.000	1,38	588.000	462.000	1,27
3	1,19	475.000	385.000	1,23	415.000	330.000	1,26
4	1,2	545.000	430.000	1,26	552.000	472.000	1,17
5	1,5	655.000	438.000	1,49	730.000	475.000	1,54
6**	1,19	605.000	515.000	1,17	615.000	530.000	1,16

* Expériences 1, 2, 3, 4 et 5 = milieu + phosphate.

** Expérience 6 = milieu + adénosine.

*** Activités spécifiques : coups/min./µmoles.

TABLEAU III

SYNTHESE DE NAD PAR DES NOYAUX CELLULAIRES DE CERVEAU DE RAT INCUBES IN VITRO EN PRESENCE DE NMN ET D'ATP DOUBLEMENT MARQUES

N° Expériences	AS précurseur	Nicotinamide-adénine-dinucléotide			Adénosine monophosphate		
	$^{14}C/^{32}P$	^{14}C	^{32}P	$^{14}C/^{32}P$	^{14}C	^{32}P	$^{14}C/^{32}P$
1*	1,19	600.000	517.000	1,15	530.000	350.000	1,5
2	1,19	630.000	502.000	1,2	585.000	517.000	1,13
3**	1,19	575.000	475.000	1,21	615.000	500.000	1,2
4	1,19	465.000	393.000	1,2	480.000	400.000	1,2
5	1,0	149.000	143.000	1,04	102.500	124.000	0,83
6	1,0	141.500	121.000	1,17	96.500	145.000	0,66
7	1,0	146.500	143.000	1,025	125.500	134.500	0,93
	$^{3}H/^{32}P$	^{3}H	^{32}P	$^{3}H/^{32}P$	^{3}H	^{32}P	$^{3}H/^{32}P$
8	1,61	544.800	360.000	1,51	149.000	107.000	1,4
	$^{3}H/^{14}C$	^{3}H	^{14}C	$^{3}H/^{14}C$	^{3}H	^{14}C	$^{3}H/^{14}C$
9***	0,57	33.600	30.400	1,1	42.500	77.000	0,55
10	0,57	42.000	74.00	0,56	41.500	75.500	0,55
11	0,57	34.000	56.500	0,6	34.400	77.500	0,45

* Expériences 1 et 2 = sans phosphate.

** Expériences 3, 4, 5, 6, 7 et 8 = avec phosphate.

*** Expériences 9, 10 et 11 = avec adénosine tritiée.

de synthèse de NAD dans les noyaux cellulaires du cerveau et du foie de rat et le rapport de radioactivité $^{14}C/^{32}P$ ou $^{3}H/^{32}P$ dans le NAD néoformé sont rapportés dans les tableaux II et III.

Comme nous l'avons déjà indiqué, en l'absence d'une quantité suffisante d'ATP dans le milieu extranucléaire, la biosynthèse de NAD n'a pas lieu ; ceci est en accord avec les travaux de REVEL[144].

Cette nécessité d'un apport d'ATP exogène en quantité suffisante pourrait s'expliquer pour une part, selon NAKAMURA et coll.[112], par l'inhibition de la niacinribonucléotidase et permet l'utilisation optimale de niacinribonucléosides et de niacinribonucléotides pour la synthèse du NAD.

Il ressort du tableau III que le rapport des activités spécifiques $^{14}C/^{32}P$ est identique dans la fraction adénylique de l'ATP du milieu extérieur et dans celle du NAD néosynthétisé. Ceci constitue un premier argument en faveur de l'existence d'un transfert en bloc du nucléotide à travers la membrane nucléaire.

On pourrait cependant envisager l'éventualité d'une déphosphorylation dans le milieu extérieur de l'ATP marqué, suivie d'une pénétration du $^{32}PO_4^{\equiv}$ dans le noyau et d'une rephosphorylation du nucléoside pour fournir le nucléoside triphosphate nécessaire à la formation du NAD. En effet, les noyaux auraient la faculté d'hydrolyser les nucléotides ajoutés au milieu, de phosphoryler les nucléosides et seraient imperméables aux nucléotides[1,121].

Afin d'exclure l'éventualité qu'il y ait dans nos expériences une hydrolyse des nucléotides dans le milieu extérieur, avec libération de nucléosides et de ^{32}P pénétrant dans le noyau, suivie d'une phosphorylation à l'intérieur du noyau une série d'incubations a été effectuée en présence de phosphate froid. Dans ces conditions, s'il y avait eu un détachement préalable du $^{32}PO_4^{=}$ et une refixation sur le nucléoside dans le noyau, le $^{32}PO_4^{=}$ devrait être dilué dans le phosphate froid ajouté au milieu et le rapport $^{14}C/^{32}P$ devrait être considérablement augmenté. En fait, il n'en est rien : que l'on ajoute du phosphate froid ou que l'on opère en son absence, le rapport des activités spécifiques $^{14}C/^{32}P$ reste le même. De plus, l'addition de nucléosides froids, qui devraient diminuer le rapport $^{14}C/^{32}P$ par dilution du "pool" des nucléosides, s'il y avait formation intermédiaire de ces molécules, ne le change guère. On retrouve le même rapport de radioactivité entre le phosphate du nucléotide et la base dans le NAD, l'AMP et l'ATP.

On pourrait évidemment penser que la synthèse s'est effectuée en dehors du noyau, l'enzyme assurant la production de NAD étant passé dans le milieu d'incubation. Dans ces conditions, la synthèse du NAD se produirait sans qu'il y ait passage de nucléosides triphosphates à travers la membrane nucléaire et la constatation de l'identité des valeurs du rapport des radioactivités $^{14}C/^{32}P$ dans l'AMP et le NAD ne prouverait pas que le nucléotide traverse "en bloc" la membrane nucléaire. Or, nous avons constaté que dans le surnageant des noyaux, obtenu

par élimination de ces derniers à l'aide d'une centrifugation après 30 min. d'incubation, il n'y a pas de NAD pyrophosphorylase, enzyme qui assure la synthèse du NAD (Tableau IV).

TABLEAU IV

PREUVE DE LA LOCALISATION INTRANUCLEAIRE DE LA NICOTINAMIDE-ADENINE-DINUCLEOTIDE PYROPHOSPHORYLASE

Foie	µg P NAD/µg P DNA
Surnageant	0
Noyau	$6,3 \cdot 10^{-2}$

Ces observations sont en accord avec les travaux de TRAUB et coll.[20] qui ont montré que la NAD pyrophosphorylase était fortement liée au noyau. Par lavages répétés des noyaux avec de l'eau, du sérum physiologique, du tampon Tris 0,1 M pH 7,5 ou du saccharose isotonique, ces auteurs n'ont pas réussi à extraire l'enzyme malgré la libération d'une partie substancielle des protéines nucléaires. Seules, des solutions de force ionique beaucoup plus élevée que celles employées dans nos incubations, peuvent faire passer l'enzyme dans le milieu extranucléaire. Ainsi, dans nos conditions expérimentales, la NAD pyrophosphorylase reste dans le noyau aux dépens des nucléotides transférés "en bloc".

Nous ne pouvons évidemment savoir, dès à présent, si c'est l'ATP ou l'AMP qui est transféré ; des recherches

ultérieures devront répondre à cette question. Il faudra, dans ce but, utiliser de l'ATP marqué dans le phosphate α par le ^{32}P et dans le phosphate γ par le ^{31}P, ce qui, pour le moment, pose des problèmes techniques difficiles.

Au cours de la synthèse de NAD effectuée par les noyaux in vitro, nous avons relevé l'importance de l'apport de deux nucléotides, le NMN et l'ATP ; d'autre part, la synthèse de NAD s'effectue par l'intermédiaire d'un enzyme, la NAD pyrophosphorylase strictement intranucléaire.

En adoptant comme test la synthèse intranucléaire de NAD à partir de NMN et d'ATP provenant d'un milieu d'incubation extranucléaire, nous avons pu démontrer que la fraction AMP de l'ATP est transportée "en bloc" dans le noyau, ce qui indique que ce nucléotide peut traverser aisément la membrane nucléaire sans être préalablement dégradé en nucléoside et en phosphate.

Chapitre 3

TRANSFERT DES PARTICULES RIBONUCLEOPROTEIQUES ET DES ACIDES RIBONUCLEOPROTEIQUES DU NOYAU AU CYTOPLASME

Les trois types d'acide ribonucléique : mRNA, tRNA et rRNA, qui interviennent dans la biosynthèse des protéines[187] sont synthétisés dans le noyau[161] et exercent essentiellement, sinon exclusivement, leur activité dans le cytoplasme. Un mécanisme de transfert doit donc assurer le passage d'un compartiment cellulaire vers l'autre.

On sait depuis 1948[14,24] que, dans les cellules animales incubées en présence d'un précurseur radioactif, les RNA du noyau se marquent beaucoup plus rapidement que les RNA du cytoplasme. Si ces cellules sont transférées dans un milieu non marqué, la radioactivité disparaît progressivement du RNA nucléaire pour apparaître dans le RNA cytoplasmique[10]. Cette observation indique clairement le passage du RNA du noyau au cytoplasme[134,122,46,154]. HARRIS[58], avait observé la disparition d'une partie de la radioactivité du RNA nucléaire au cours du transfert nucléo-cytoplasmique et récemment McCARTHY et coll.[91] sur des cellules HeLa, JACOB et coll.[75] sur des cellules nerveuses ont pu préciser qu'une fraction seulement du RNA nucléaire passe dans le cytoplasme.

Par une méthode autohistoradiographique, STEVENS et SWIFT[173] montrent que les RNA formés au niveau des anneaux de Balbiani de larves de Chironome, se retrouvent dans le

le canal étroit des pores de la membrane nucléaire, apportent ainsi une indication précise concernant le transfert des RNA du noyau dans le cytoplasme.

En employant les précurseurs radioactifs, $^{32}PO_4^{\equiv}$ et adénine-^{14}C, REVEL[142] et WINTZERITH[193] ont étudié la synthèse des RNA par des noyaux de cellules rénales et hépatiques du rat. Ils ont observé la sortie dans le milieu d'incubation d'un RNA d'activité spécifique élevée. Nous avons cherché à préciser le mécanisme du transport des RNA du noyau dans le cytoplasme en isolant les particules qui se trouvent au niveau de la membrane nucléaire, avant de passer dans le cytoplasme ; ce transfet sera étudié après injection de précurseurs radioactifs des acides nucléiques in vivo et également après incubation de noyaux en présence de précurseurs marqués in vitro.

En vue de l'étude de la biosynthèse des RNA dans le noyau et de leur transfert dans le milieu extranucléaire, nous avons procédé, tout d'abord, à une série d'expériences ayant pour objectif la détermination des conditions optimales de préparation et d'incubation des noyaux. Au cours de nos recherches, nous avons été amené à étudier l'effet du Mg^{++} sur la diffusion des RNA nucléaires dans le milieu extranucléaire.

I. ACTIONS DES IONS MAGNESIUM SUR LE PASSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES DU NOYAU DANS LE MILIEU EXTRANUCLEAIRE IN VITRO.

L'importance des ions Mg^{++} comme cofacteurs dans le maintien de la structure et des fonctions des diverses

fractions subcellulaires a fait l'objet de nombreux travaux[24, 54,42,167,193,197].

Nous nous sommes intéressé au rôle éventuel du Mg^{++} dans le transfert des RNA et des DNA des noyaux dans un milieu d'incubation in vitro. Il est, en effet, intéressant d'étudier in vitro certains phénomènes métaboliques intervenant au niveau des noyaux dans un environnement défini dont on peut changer la composition en fonction des problèmes posés.

Un transfert des particules ribonucléoptotéiques des noyaux dans leur milieu d'incubation a été signalé par divers auteurs[36,90,92,94,148,156,158,159,172,193]. Ce phénomène pose évidemment le problème de la perméabilité de la membrane nucléaire d'une part[36] et de la pureté des préparations nucléaires d'autre part.

SCHNEIDER, avait constaté que l'ATP et les citrates stimulent la fuite du RNA des noyaux au cours de l'incubation et a attribué cet effet à une diminution du magnésium ionisé[156].

A l'opposé, MONTREUIL a observé depuis,que la diffusion des RNA du noyau à travers la membrane nucléaire est favorisée en présence de solutions de saccharose phosphatées, alors qu'elle est notablement réduite au cours de la préparation des noyaux dans un milieu citrate-saccharose[35]. Nous avons constaté antérieurement que le taux d'ions Mg^{++} affecte la répartition du RNA entre le milieu extérieur et les noyaux incubés dans un milieu synthétisé. Aussi, nous a-t-il paru intéressant d'entreprendre une étude systématique de l'influence des concentrations d'ions Mg^{++} sur le transfert dans le milieu

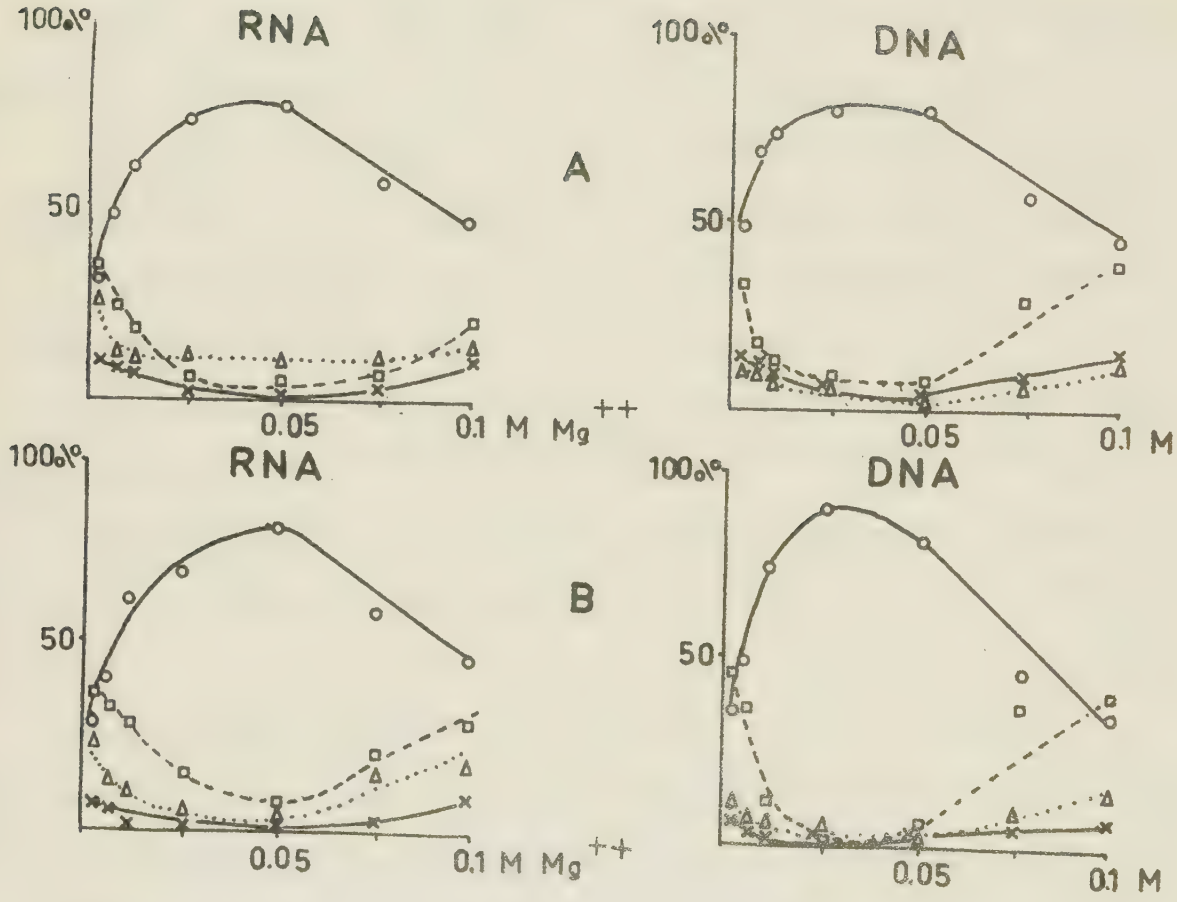


FIGURE 4 :

Pourcentages de sortie des RNA et DNA après incubation des noyaux cellulaires de foie de rat in vitro à 37° dans un milieu de Logan pour des concentrations en Mg^{++} variant de 0 à 0,1 M.

- Noyaux incubés
- Sédiment 15.000 g
- Sédiment 105.000 g
- Surnageant 105.000 g

A : p.cent de sortie des RNA et DNA des noyaux préparés selon la méthode de CHAUVEAU.

B : p.cent de sortie des RNA et DNA des noyaux préparés selon les méthodes combinées de CHAUVEAU et de ZALTA.

extérieur des acides nucléiques des noyaux de foie de rat incubés *in vitro*.

1) Résultats.

L'incubation *in vitro* des noyaux préparés selon la méthode de CHAUVEAU[27] dans un milieu de LOGAN en présence de concentrations de Mg^{++} variant de 0 à 0,1 M, fait apparaître deux situations extrêmes en ce qui concerne le maintien et la sortie des acides nucléiques des noyaux. Les données concernant le passage des acides nucléiques des noyaux dans le milieu extérieur dans ce dernier cas, comme pour les concentrations intermédiaires de Mg^{++} sont résumées dans les tableaux 5 et 6 et dans la figure 4. En absence de Mg^{++} et pour des concentrations en Mg^{++} supérieures à 0,05 M, il se forme des agglomérats ayant un aspect de gels.

En l'absence d'ions Mg^{++} dans le milieu d'incubation, on constate une perte de 68 % de RNA nucléaire et de 55 % de DNA nucléaire pour les noyaux préparés selon la technique de CHAUVEAU et respectivement de 72 % et de 64 % en moyenne pour les RNA et DNA nucléaires des noyaux traités aux détergents[196].

En augmentant la concentration en Mg^{++} du milieu d'incubation on voit diminuer la sortie du RNA et du DNA jusqu'à un taux minimal atteint pour une concentration en Mg^{++} comprise entre 0,025 M et 0,05 M. A ces concentrations, environ 21 % du RNA et du DNA quittent les noyaux préparés selon la technique de CHAUVEAU et respectivement 18 % et 7 % de RNA et de DNA sortent des noyaux traités aux détergents. A des concentrations d'ions Mg^{++} supérieures, allant de 0,05 à 0,1M,

TABLEAU V

REPARTITION QUANTITATIVE DES RNA ET DNA DES DIFFERENTES FRACTIONS OBTENUES APRES INCUBATION DES NOYAUX IN VITRO EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN Mg^{++}

Concentration en ions Mg^{++}	0	0,005M	0,01M	0,025M	0,05M	0,075M	0,1M
A) NOYAUX NON TRAITES AUX DETERGENTS (Méthode selon CHAUVEAU)							
	µg P RNA						
Noyaux incubés	8,1	12,1	14,1	16,5	16,5	15,3	13,7
Sédiment 15.000g	1,4	2,1	1,7	0,6	0,6	4,0	3,0
Sédiment 105.000g	9,1	7,4	4,2	1,4	1,2	3,7	5,9
Surnageant 105.000g	6,6	3,2	2,1	3,3	2,5	3,8	3,2
	µg P DNA						
Noyaux incubés	69,0	88,0	77,0	81,0	80,0	73,0	70,0
Sédiment 15.000g	21,0	7,0	8,0	6,0	6,0	8,0	12,0
Sédiment 105.000g	48,0	22,0	9,0	6,0	6,0	40,0	58,0
Surnageant 105.000g	13,0	9,0	12,0	9,0	13,0	12,0	20,0
B) NOYAUX TRAITES AUX DETERGENTS (Méthode selon ZALTA)							
	µg P RNA						
Noyaux incubés	14,6	14,6	20,8	27,0	36,0	28,0	20,0
Sédiment 15.000g	3,5	3,2	traces	traces	0,5	1,9	3,1
Sédiment 105.000g	20,6	14,0	12,0	7,0	4,0	10,0	12,0
Surnageant 105.000g	14,0	5,0	5,0	3,0	4,7	8,0	7,0
	µg P DNA						
Noyaux incubés	144,0	191,0	266,0	292,0	173,0	115,0	92,0
Sédiment 15.000g	22,0	19,0	8,0	8,0	14,0	19,0	15,0
Sédiment 105.000g	110,0	100,0	27,0	9,0	15,0	100,0	110,0
Surnageant 105.000g	30,0	23,0	16,0	9,0	11,0	27,0	39,0

TABLEAU VI

RAPPORT RNA/DNA DES DIFFERENTES FRACTIONS OBTENUES APRES INCUBATION IN VITRO DES NOYAUX PREPARES

Concentration en ions Mg^{++}	0	0,005M	0,01M	0,025 M	0,05M	0,075M	0,1M
A) NOYAUX NON TRAITES AUX DETERGENTS (Méthode selon CHAUVEAU)							
Noyaux incubés	0,12	0,14	0,18	0,20	0,20	0,21	0,19
Sédiment 15.000g	0,07	0,29	0,22	0,12	0,12	0,53	0,27
Sédiment 105.000g	0,19	0,37	0,47	0,25	0,20	0,09	0,10
Surnageant 105.000g	0,51	0,35	0,16	0,36	0,20	0,31	0,16
B) NOYAUX TRAITES AUX DETERGENTS (Méthode selon ZALTA							
Noyaux incubés	0,11	0,08	0,08	0,10	0,09	0,20	0,25
Sédiment 15.000g	0,16	0,17	--	--	0,03	0,10	0,20
Sédiment 105.000g	0,19	0,14	0,45	0,80	0,27	0,10	0,11
Surnageant 105.000g	0,47	0,22	0,31	0,35	0,43	0,30	0,18

les transferts d'acides nucléiques des noyaux incubés vont jusqu'à 48 et 54 % pour les RNA et DNA des noyaux préparés selon CHAUVEAU ; les valeurs sont légèrement plus élevées dans le cas des noyaux traités aux détergents ; elles sont respectivement de 51 % pour le RNA et de 63 % pour le DNA.

Ainsi, le magnésium apparaît comme un facteur intervenant dans le maintien des acides nucléiques dans les noyaux au cours d'une incubation in vitro. Le traitement des noyaux par les détergents entraîne une fuite d'acides nucléiques légèrement plus sensible aux concentrations faibles ou fortes de Mg^{++}, alors que les transferts de RNA sont du même ordre de grandeur dans le cas des concentrations optimales (0,025 à 0,050 M Mg^{++}). Dans ces conditions, le passage des acides nucléiques des noyaux traités aux détergents dans le milieu ambiant,paraît même plus faible, quoique la différence ne soit pas significative. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'au cours de l'incubation des noyaux préparés selon CHAUVEAU, il s'effectue une désorption des ribosomes accolés à la membrane nucléaire externe ; ces derniers,libérés dans le milieu d'incubation, comptent dans le bilan du mouvement de RNA. Les détergents qui enlèvent les contaminations cytoplasmiques de la membrane nucléaire font disparaître ce phénomène.

Ainsi, le traitement par des détergents, tels les nonylphénolpolyoxyéthylènes à plusieurs molécules d'oxyde d'éthylène, ne modifie pas sensiblement le transfert des nucléoprotéines ou du RNA à partir du noyau in vitro si le taux optimal de Mg^{++} est respecté.

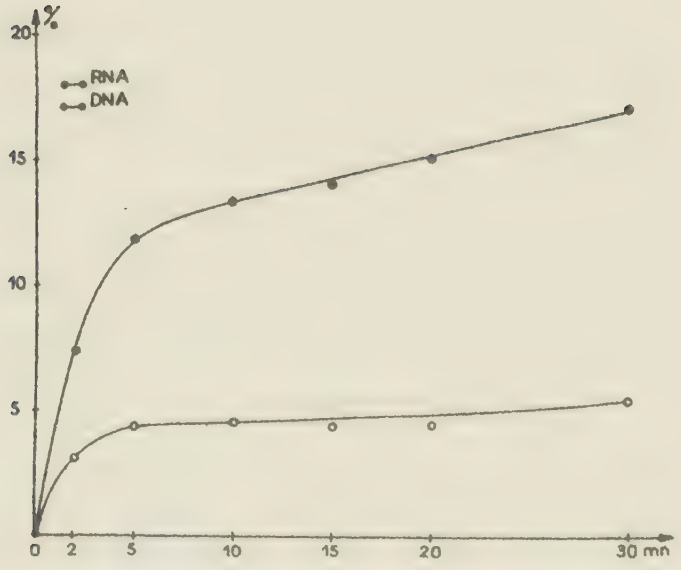


FIGURE 5 :

Cinétique de sortie des acides nucléiques vers le milieu extranucléaire après incubation in vitro des noyaux, préparés selon les méthodes combinées de CHAUVEAU et de ZALTA, pour une concentration en Mg^{++} de 0,025 M.

En ce qui concerne la cinétique de la sortie des acides nucléiques du noyau, la figure 5 révèle que le RNA retrouvé dans le milieu d'incubation quitte surtout le noyau, pour des concentrations optimales de Mg^{++}, dans les premières minutes ; il en est de même pour le DNA. Il apparaît également que la sortie des acides ribonucléiques des noyaux incubés, d'abord rapide, se poursuit à un rythme ralenti.

Les valeurs rapportées dans les tableaux V, VI et VII montrent, que dans les conditions optimales de concentration en Mg^{++}, la quantité de RNA extranucléaire qui sédimente à 15.000 g est négligeable, tandis que 70 % sédimentent au bout de 3 h à 105.000 g et que 30 % se trouvent dans la fraction non sédimentable à 105.000 g.

TABLEAU VII

REPARTITION EN POUR CENT DES RNA TRANSFERES DANS LE MILIEU EXTERIEUR EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN Mg^{++}

Concentration en ions Mg^{++}	0	0,005M	0,01M	0,025M	0,05M	0,075M	0,1M
Sédiment 15.000g	9,2	14,5	traces	traces	5,45	10,0	14,0
Sédiment 105.000g	54,0	63,0	70,5	70,0	44,0	50,0	54,0
Surnageant 105.000g	36,8	22,5	29,5	30,0	50,5	40,0	32,0

On détecte dans toutes les fractions du DNA, ou des traces de DNA, ce qui traduit la présence de particules désoxyribonucléoprotéiques.

2) Discussion.

Nos expériences soulèvent le problème de l'importance de la pureté de la préparation nucléaire dans l'étude du transfert des acides nucléiques dans le milieu d'incubation et le rôle essentiel du Mg^{++} dans ce phénomène.

En l'absence d'une quantité suffisante d'ions Mg^{++} on observe des pertes d'acides nucléiques ou de nucléoprotéines nucléoires qui sont à rapprocher des observations d'ALLFREY et MIRSKY[11] sur les noyaux de thymus de veau. Ces auteurs notent, dans ces conditions et surtout pour des pH supérieurs à 7,3, la formation d'un gel épais qui tend à s'étendre à l'intérieur des noyaux ; ce gel, en gonflant, rompt les noyaux. Une altération importante des noyaux isolés du thymus de veau au cours d'incubation en absence de Mg^{++} a également été décrite par KODAMA et TEDESCHI[82]. D'après SZAFARZ[171], la libération des substances nucléiques en absence de Mg^{++} serait régulière et proportionnelle au temps d'incubation des noyaux.

A des taux de Mg^{++} supérieurs à 0,05 M se manifestent également des pertes de nucléoprotéines ou d'acides nucléiques.

Quel est le rôle de la membrane nucléaire et du Mg^{++} dans les échanges ou dans le transfert du RNA du noyau dans l'espace extranucléaire? Selon SIEBERT[164], il y aurait des échanges libres de certaines substances, enzymes ou substrats, entre le noyau et le cytoplasme,sans qu'intervienne une barrière quelconque au niveau de la membrane nucléaire. Pour d'autres constituants, tel le Na^{+}, il n'y a pas d'équilibration des deux côtés de la membrane nucléaire. D'après nos résultats, la concentration

en Mg^{++} jouerait un rôle fondamental dans le transfert d'acides ribonucléiques ou de particules ribonucléoprotéiques à travers la membrane nucléaire.

A un taux optimal de Mg^{++}, qui se situe entre 0,025 et 0,050 M, la sortie des RNA ou des particules ribonucléoprotéiques du noyau est à son minimum ; on peut toutefois distinguer deux vitesses de transfert, une rapide et une lente qui doivent correspondre à diverses formes de transport de RNA.

La suggestion que le Mg^{++} empêche la libération de particules ribonucléoprotéiques du noyau en les précipitant[171] ne peut pas être retenue, vu l'accroissement des fuites du RNA du noyau quand on augmente la teneur en Mg^{++} du milieu d'incubation.

La perte de RNA au cours des préparations de noyaux en milieu contenant des phosphates[36] pourrait s'expliquer par la formation de phosphate de Mg qui réduirait le taux de Mg^{++} disponible pour le maintien au niveau de la membrane nucléaire des échanges physiologiques assurés par la présence de Mg^{++}.

Rappelons qu'en ce qui concerne le rôle du Mg^{++} au niveau de la membrane nucléaire, différents auteurs dont CARVALHO[24], admettent que la nature de l'interaction des cations divalents avec les membranes naturelles et synthétiques serait un type d'échange cationique d'adsorption et désorption

sur les sites anioniques des composants chimiques de la membrane. Ces échanges affecteraient la perméabilité et les propriétés électriques de la membrane. La résistance et la perméabilité des membranes seraient réglées par les taux de cations divalents (Ca^{++} ou Mg^{++}) liés au phospholipide des membranes.

Signalons également que, tout récemment, MacGREGOR et MAHLER[95], étudiant les synthèses de RNA des noyaux de foie, ont mis en évidence l'existence de concentrations optimales en Mg^{++} pour le maintien de la morphologie nucléaire.

Quant à l'aspect quantitatif du transfert des RNA dans l'espace extranucléaire in vitro, on pourrait se demander si une partie des RNA n'avait pas déjà quitté les noyaux au cours de leur préparation. Ceci paraît, a priori, peu vraisemblable puisque, dans nos conditions expérimentales, les noyaux préparés selon CHAUVEAU ou en présence de détergents, ont un rapport RNA/DNA respectivement de 0,210 et 0,200 très voisin de celui obtenu par SIEBERT[164] sur des noyaux isolés dans un milieu organique : 0,230 ± 0,014.

Il est difficile d'affirmer d'une façon formelle que la cinétique in vitro reflète effectivement les phénomènes qui se produisent in vivo. Il convient cependant d'admettre que la sortie des RNA du noyau est sélective et s'explique simplement par une libre diffusion des RNA qui ne sont pas retenus par les nucléoles ou la liaison avec la chromatine.

Les fractions des RNA nucléaires qui restent dans le noyau après incubation in vitro sont nettement inférieures à celles que l'on trouve dans les noyaux fraîchement préparés. Les formes de transfert des RNA dans le milieu extérieur seront discutées plus loin.

II. BIOSYNTHESE DES ACIDES NUCLEIQUES DANS LES NOYAUX CELLULAIRES ET TRANSFERT DES DIVERS TYPES D'ACIDES RIBONUCLEIQUES DANS LE MILIEU EXTERIEUR.

Bien qu'il y ait de nombreux travaux plaidant en faveur de la présence de ribosomes à l'intérieur des noyaux d'un certain nombre de types cellulaires [44,45,47,48,130,141,182,191], on sait peu de choses sur leurs fonctions dans les noyaux isolés.

La présence d'acides ribonucléiques dans le noyau et le long des chromosomes a été établie depuis 1940 par BRACHET[15] Du RNA sous forme particulaire a été reconnu récemment dans le noyau par les équipes de FRENSTER[45], WANG[182] et POGO[130].

L'examen des noyaux cellulaires au microscope électronique montre la présence de grains ayant les dimensions de ribosomes cytoplasmiques dans le nucléole, sur les chromosomes, sur les membranes nucléaires et dans le suc nucléaire[182a,b], [44,130,185,186].

Ces particules joueraient un rôle dans la synthèse des protéines nucléaires en conjonction avec des mRNA et leur fonction dépendrait de la synthèse de RNA de type messager.

Récemment McCARTHY et coll.[91] ont isolé des fractions subnucléaires de foie de rat à partir de noyaux dépourvus,

par sonication, de leurs membranes nucléaires externes ; ces fractions possèdent la propriété de synthétiser des protéines selon un mécanisme analogue à celui trouvé dans le cytoplasme.

Après avoir déterminé les conditions adéquates de préparation des noyaux dépourvus de membranes nucléaires externes auxquelles des ribosomes sont accolés et le choix d'un milieu d'incubation adéquat, nous avons cherché à analyser la nature des RNA néosynthétisés qui passent dans le milieu extérieur.

Nous étudierons successivement : A) la biosynthèse et la diffusion des RNA nucléaires après incubation in vitro en présence de précurseurs marqués, adénine-^{14}C et ^{32}P ; B) le transfert des acides nucléiques du noyau dans le cytoplasme après incorporation in vivo de précurseurs marqués.

A. Diffusion des RNA nucléaires après incorporation in vitro de précurseurs radioactifs des acides nucléiques.

1) Incorporation d'adénine ^{14}C par les noyaux cellulaires de foie de rat incubés in vitro. Etude de la sédimentation des particules nucléaires ayant diffusé à travers la membrane nucléaire. Action de l'EDTA.

A la suite des travaux de REVEL qui avait constaté qu'une fraction appréciable de RNA nucléaire d'activité spécifique élevée passait des noyaux des cellules de reins de rat dans le milieu d'incubation au bout de quelques minutes, nous avons analysé par centrifugation différentielle en gradient de saccharose cette fraction diffusible à partir des noyaux de foie maintenus en survie dans le milieu décrit plus haut.

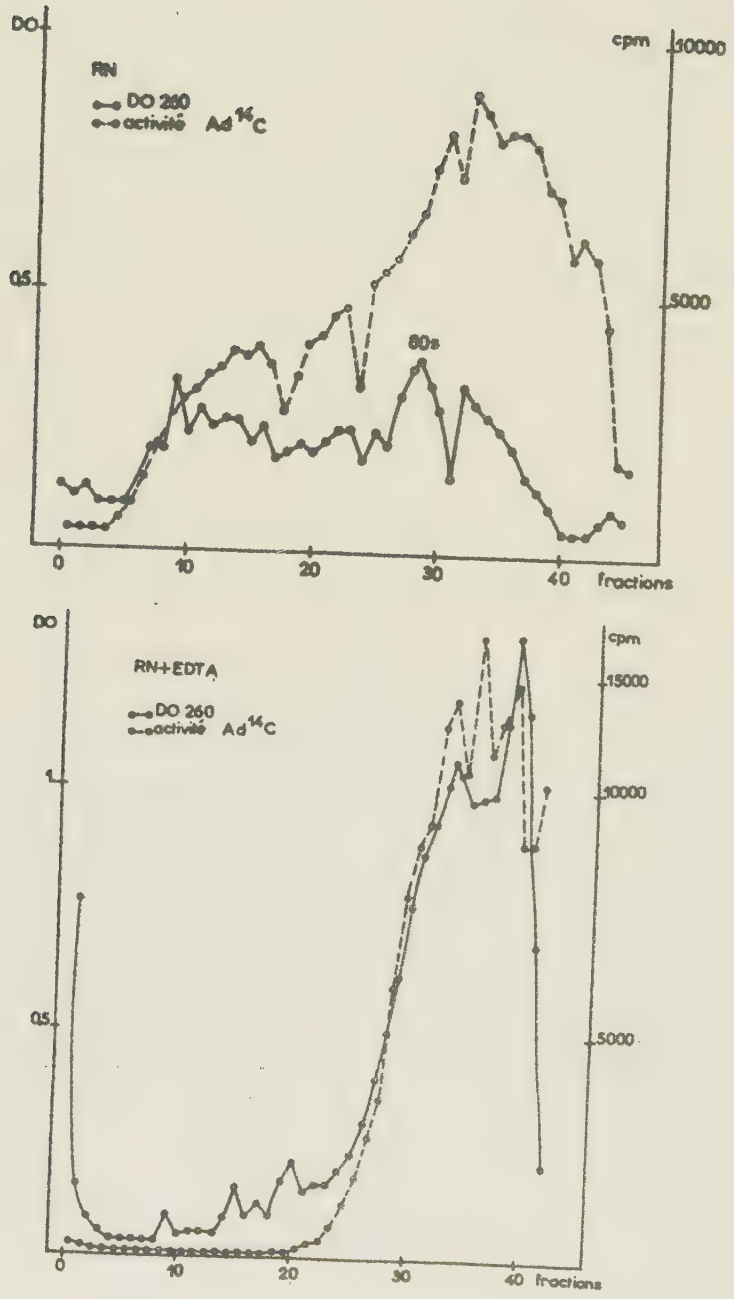


FIGURE 6 :

Sédimentation des ribosomes nucléaires (RN) de foie de rat en gradient de saccharose 10 - 34 %. Centrifugation de 2h30 dans un rotor SW 25_1 à l'ultracentrifugeuse Spinco L. Action de l'EDTA (0,01 M).

Ainsi, des noyaux préparés selon la méthode de CHAUVEAU ont été incubés en présence d'adénosine triphosphate (ATP), d'un inhibiteur de la ribonucléase nucléaire : le polyvinylsulfate (PVS) et d'un précurseur radioactif des acides nucléiques (AN) l'adénine-8-^{14}C (1,5 µCi/ml) dans le milieu de Logan^{90}.

Après l'incubation, les noyaux sont séparés du milieu extranucléaire par centrifugation à vitesse lente (700 g) ; après élimination des débris nucléaires qui sédimentent à 20.000 g, le surnageant est soumis à une centrifugation pendant 3 h à 104.000 g et l'on recueille un culot de particules. Ces particules qui présentent une structure analogue à celle des particules RNP cytoplasmiques (Fig.3) ont été analysées en gradient de saccharose. Pour ce faire, une fraction de ces particules est mise en suspension dans le milieu de KORNER, et l'autre dans un milieu qui en diffère par l'absence d'ions Mg^{++} et la présence d'EDTA (0,01 M). Les deux suspensions (1 ml chacune) sont déposées sur des gradients de saccharose 10-34 % et sont centrifugées pendant 2h30 à 25.000 tours/min. (Swinging Rotor, type SW 25, ultracentrifugeuse Spinco L). Après cette ultracentrifugation, on perce le fond des tubes avec une aiguille calibrée et l'on recueille des fractions de 10 gouttes. Pour déterminer l'absorption dans l'UV à 260 mµ, on ajoute à chaque fraction 2,5 ml d'H_2O. La radioactivité de ces fractions est mesurée selon la technique précédemment décrite dans la partie "méthodes". Les valeurs sont rapportées dans la figure 6.

L'éthylène-diamine-tétraacétate (EDTA) est un agent chélateur qui dissocie les polysomes en sous-unités ribosomiques. Ainsi, le RNA messager ne peut se fixer sur les ribosomes en présence d'EDTA.

Les particules isolées du milieu de LOGAN (phase extranucléaire) après incubation des noyaux montrent, après fractionnement en gradient de saccharose, une importante radioactivité localisée au niveau des zones à coefficient de sédimentation élevé, de même qu'au niveau des monosomes et des particules plus légères (figure 6). A en juger d'après le tracé établi de l'absorption dans l'UV, la distribution du matériel est assez voisine dans les diverses zones du gradient.

Après action de l'EDTA, on observe une diminution brutale des pics de radioactivité et d'absorption dans l'UV au niveau des polysomes et ribosomes avec la formation de sous-unités ribosomales. La radioactivité disparaît quasi entièrement dans les régions des polysomes et des monosomes.

Nos premiers résultats suggèrent l'existence de polysomes dans le milieu extérieur aux noyaux maintenus en survie in vitro.

Tout comme pour les ribosomes cytoplasmiques, la structure et les propriétés de sédimentation des particules RNP du milieu d'incubation des noyaux varient avec la concentration en ions Mg^{++}. Mais on pourrait également se demander s'il s'agit effectivement d'une diffusion des ribosomes à travers la membrane nucléaire vers le milieu d'incubation. Comme les noyaux avaient été préparés sans détergents et que, dans ces conditions,

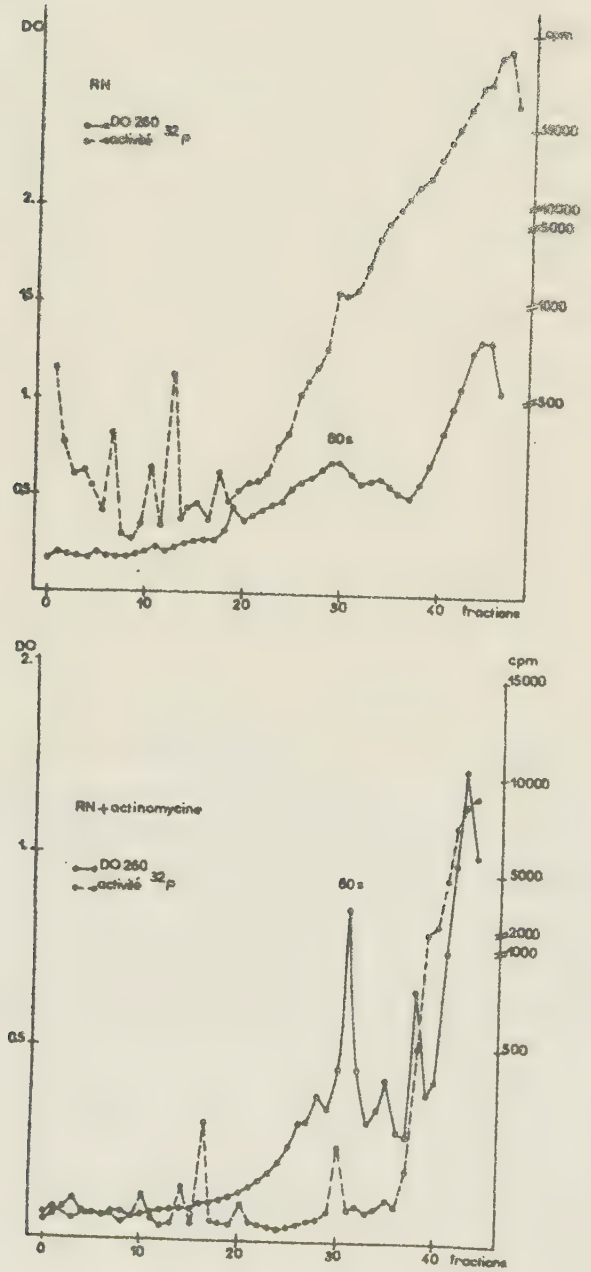


FIGURE 7 :

Sédimentation des ribosomes nucléaires de foie de rat en gradient de saccharose 10 - 34 %. Centrifugation de 2h30 dans un rotor SW 25_1 à l'ultracentrifugeuse Spinco L. Action de l'actinomycine (2 µg/ml).

des ribosomes cytoplasmiques restaient attachés à la membrane nucléaire externe, on pourrait imaginer que les ribosomes ont contribué à la formation de polysomes radioactifs avec le mRNA fraîchement synthétisé dans le noyau cellulaire après passage de ce mRNA à travers la membrane nucléaire.

2) Incorporation de $^{32}PO_4^{\equiv}$ en présence d'actinomycine dans les noyaux incubés in vitro.

Une expérience analogue à la précédente a été effectuée en remplaçant l'adénine-^{14}C par du $^{32}PO_4^{\equiv}$ (5 µCi/ml) et en procédant simultanément à deux incubations, l'une en présence d'actinomycine (2 µg:ml), l'autre servant de témoin.

L'actinomycine se lierait irréversiblement au DNA en solution. On sait que ce composé inhibe dans les cellules bactériennes et animales la synthèse des RNA et du DNA[154]. L'inhibition de la synthèse du RNA dans les cellules animales varie en fonction de la dose[59] ; pour une dose suffisante, on observe une disparition des polysomes[120]. PENMAN[120] et d'autres auteurs[100] ont observé que les polysomes disparaissent sous l'action de l'actinomycine et qu'il y a inhibition de la synthèse de RNA nucléaire, mais ceci varie en fonction de la concentration en actinomycine[59].

L'observation de nos graphiques (Fig.7) révèle que la formation de type polysomique est inhibée par l'actinomycine. La radioactivité observée dans les incubations témoins fait défaut si les noyaux sont incubés en présence de l'antimitotique. Ceci indique que le RNA radioactif qui marque les polysomes en l'absence de l'antimitotique a bien été néosynthétisé

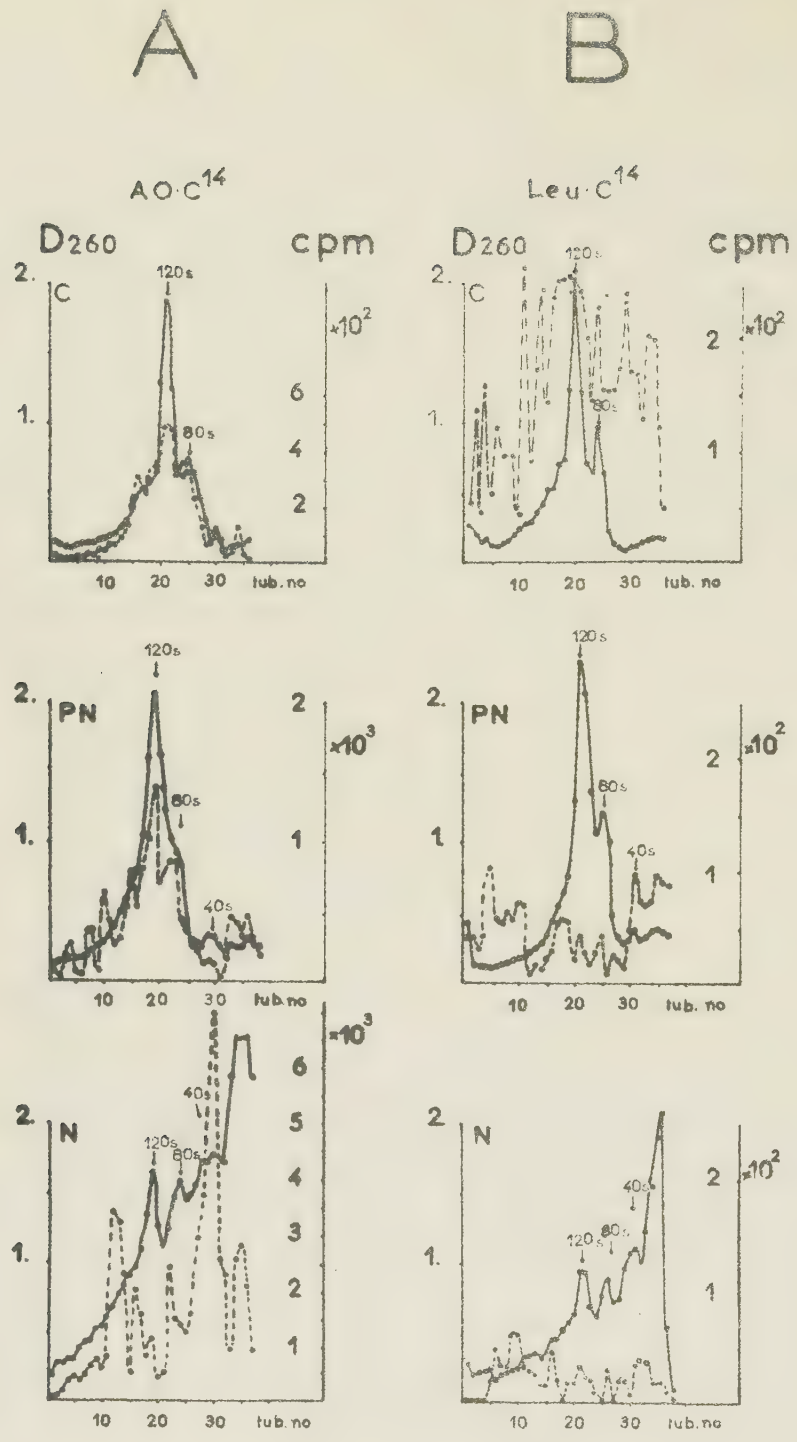


FIGURE 8 :

Sédimentation des particules RNP cytoplasmiques (C), périnucléaires (PN) et nucléaires (N) de foie de rat en gradient de saccharose 10 -34 % (2h30, rotor SW 25.1 à l'ultracentrifugeuse Spinco L2) après marquage in vivo.

A : à l'acide orotique ^{14}C (acide orotique ^{14}C, 20µC/rat)

B : à la leucine ^{14}C (leucine ^{14}C, 100 µC/rat).

et c'est lui qui associe les ribosomes pour former les polysomes. La diminution de la radioactivité au niveau des polysomes prouve bien qu'il n'y a pas de synthèse de RNA messager permettant l'association des ribosomes. Quant à la question de savoir si ce RNA de type messager forme les polysomes à partir de ribosomes nucléaires ou des ribosomes attachés à la membrane nucléaire externe, l'expérience avec l'actinomycine ne permet pas de conclure. C'est la raison pour laquelle nous avons réalisé une série d'expériences en utilisant des noyaux traités aux détergents. Dans ce cas, nous avons également obtenu des polysomes qui ne pouvaient être formés qu'à partir de ribosomes nucléaires (figure 8A-N) . Nous ne savons évidemment pas si ces polysomes ont été formés dans le noyau ou en dehors du noyau dans le milieu d'incubation. L'ensemble de ces données conduit à penser qu'après une rapide synthèse dans le noyau le RNA messager se retrouve dans un très bref délai dans le milieu extérieur sous forme de polysomes.

Pour répondre à ce problème, nous avons recherché la nature du RNA et la forme sous laquelle il se trouve dans la membrane PN en pensant que ceci pourrait nous fournir des renseignements sur le transfert des RNA du noyau du cytoplasme.

Après marquage <u>in vivo</u> avec des précurseurs radioactifs, nous avons étudié la sédimentation des particules RNP nucléaires et de leurs RNA comparativement aux particules RNP et aux RNA du cytoplasme. Ces expériences ont été complétées par la détermination de la composition en bases de ces RNA d'une part et par l'analyse de la synthèse des protéines au niveau de ces particules d'autre part.

B) Etude de la diffusion des RNA nucléaires après incorporation in vivo de précurseurs marqués des acides nucléiques.

1) Après incorporation d'acide orotique ^{14}C in vivo

L'acide orotique est un précurseur de l'uracile et à plus forte raison de l'acide uridylique, un des quatre nucléotides composant les acides ribonucléiques. On sait par ailleurs qu'à l'exception des RNA éventuellement synthétisés dans les mitochondries, tous les autres RNA cytoplasmiques sont formés dans le noyau cellulaire[2,101,123,134].

Pour étudier l'évolution du RNA nucléaire nouvellement synthétisé, il importe de suivre l'incorporation du précurseur marqué pendant un temps suffisamment court. Nous avons donc étudié l'incorporation d'acide orotique-6-^{14}C dans les divers compartiments cellulaires du foie de rat deux heures après l'administration in vivo ; la quantité injectée par voie intrapéritonéale variant entre 20 et 30 µCi/rat.

a) Préparation des noyaux cellulaires et isolement des fractions cytoplasmiques, périnucléaires et nucléaires

Lors de la préparation des noyaux cellulaires de foie de rat selon la technique de CHAUVEAU, l'homogénat de foie est séparé en un surnageant cytoplasmique d'une part et un culot de noyaux d'autre part. Des particules RNP cytoplasmiques sont ensuite obtenues par centrifugation de l'homogénat cytoplasmique à 20.000 g pour séparer les mitochondries et, par traitement du surnageant postmitochondrial au DOC suivi d'une centrifugation de 3 h à 105.000 g. Afin d'éviter lors de la préparation des noyaux une contamination par les ribosomes cytoplasmiques

présents au niveau de la membrane nucléaire externe, nous avons purifié les noyaux des cellules de foie de rat à l'aide de détergents selon la technique de ZALTA légèrement modifiée. Au cours de la purification de la préparation nucléaire après le 2ème traitement au détergent, nous avons isolé dans le surnageant des noyaux une fraction en suspension qui représente la membrane périnucléaire. L'observation en microscopie électronique de noyaux isolés selon ce procédé montre en effet que le deuxième traitement aux détergents enlève la membrane périnucléaire à laquelle se trouvent accolés des ribosomes dans les noyaux non traités (figures 1 et 3).

La fraction membranaire périnucléaire a été traitée au DOC et soumise à une centrifugation de 20.000 g pour éliminer les débris membranaires ; puis le surnageant a été centrifugé 3 heures à 105.000 g. Nous avons pu isoler des particules RNP qui ont un profil de sédimentation en gradient de saccharose analogue à celui de l'ensemble des polysomes et des ribosomes cytoplasmiques (Fig. 8, C et PN). Il faut noter que ces particules périnucléaires ne peuvent être obtenues à partir de la fraction membranaire qu'après traitement au désoxycholate ; ce détergent dissout les membranes et permet ainsi la libération des particules. En dehors des particules RNP présentes dans la membrane périnucléaire la présence d'autres particules a été décrite dans le noyau même[35,36,103]. Celles-ci diffusent dans le milieu extranucléaire quand on incube les noyaux in vitro; ces particules sont isolées du milieu d'incubation après élimination par centrifugations des noyaux, puis des débris

nucléolaires et centrifugation du surnageant 3 h à 105.000 g ; ces particules sont désignées sous le nom de "ribosomes nucléaires". MONTREUIL et coll., au cours d'une étude sur la diffusion des constituants phosphorylés des noyaux, ont également isolé à partir d'une fraction nucléaire diffusible, une fraction sédimentable représentant une classe particulière de ribosomes[35,36,107]. Nous avons pu observer dans la permière partie de ce chapitre que la contamination des ribosomes nucléaires par la chromatine est minime si le milieu d'incubation contient du Cl_2Mg 0,025 M. On sait que le Mg^{++} est nécessaire au maintien de l'intégrité structurale des particules subcellulaires et des chromosomes[27,156]. Après marquage in vivo, nous avons comparé l'incorporation d'acide orotique ^{14}C dans les acides nucléiques des ribosomes nucléaires, des particules périnucléaires et des particules cytoplasmiques.

b) Analyse de la sédimentation des particules ribonucléoprotéiques cytoplasmiques, périnucléaires et nucléaires

Tout comme pour les expériences d'incorporation in vitro, nous avons étudié la sédimentation de particules RNP cytoplasmiques, périnucléaires et nucléaires sur gradient de saccharose.

L'examen du tracé de l'absorption ultraviolette à 260 mμ des fractions de ces différentes particules, après centrifugation pendant 2 h 30 en gradient de saccharose 10-34 % montre l'existence de mono-,di-et polysomes parmi les particules nucléaires, périnucléaires et cytoplasmiques (Fig. 8, C, PN, N)

- Etude des particules RNP nucléaires.

En ce qui concerne les particules nucléaires (N) on peut observer que le pic dominant à l'absorption ultraviolette à

260 mμ si situe dans la zone des particules légères (Fig.8,N). Nous ne saurions affirmer que le taux relatif des particules légères (40 S) et des particules lourdes ($\geqslant$ 80 S) que nous constatons corresponde à l'état in vivo. On a montré, en effet, la présence de ribonucléase à l'intérieur des noyaux[12,87,147,165,174] et la difficulté d'isoler de ce fait des polysomes nucléaires. Nous avons cependant pris la précaution d'incuber les noyaux en présence d'un inhibiteur de la RNase, le polyvinylsulfate (PVS).

Après l'observation du tracé de l'absorption dans l'UV, il est intéressant de le comparer avec le tracé de la radioactivité obtenu parallèlement après deux heures d'incorporation in vivo d'acide orotique ^{14}C à raison de 20 μCi par rat.

Le tracé de la radioactivité du RNA déterminé parallèlement à celui de l'UV révèle la présence dans la zone des particules lourdes comme dans la zone des particules légères des RNA d'une très haute radioactivité. Celle-ci est pour les mono, di et polysomes, nettement supérieure à celle des particules correspondantes d'origine périnucléaire ou cytoplasmique (Fig. 8, A).

A la suite de l'observation d'une activité spécifique élevée au niveau des particules RNP nucléaires légères, (Fig. 8, N et 9, N) nous avons essayé de les isoler et de les localiser d'une façon plus précise en adoptant la technique de JOKLIK et BECKER[76] qui met en oeuvre des gradients de saccharose 15 - 30 % dans un tampon RSB.

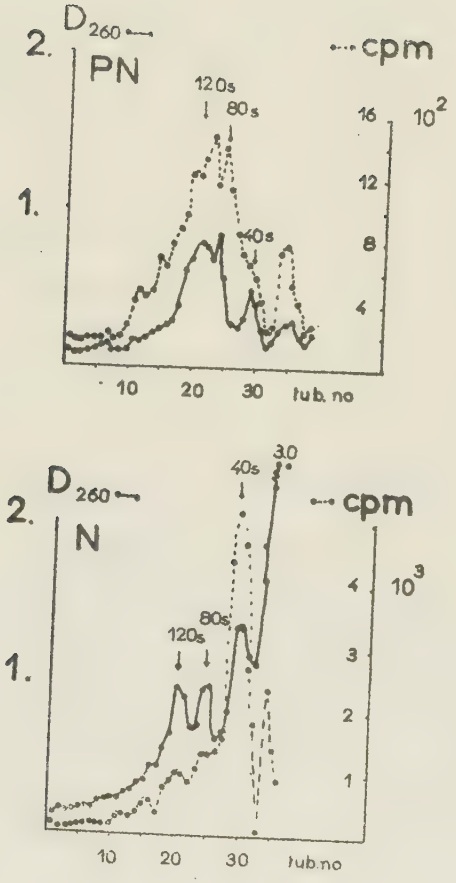


FIGURE 9 :

Sédimentation des particules RNP périnucléaires (PN) et nucléaires (N) en gradient de saccharose 10 - 34 % (2h30, rotor SW 25_1, Spinco L2) après marquage de 2h à l'acide orotique ^{14}C *in vivo* (30 µC/rat).

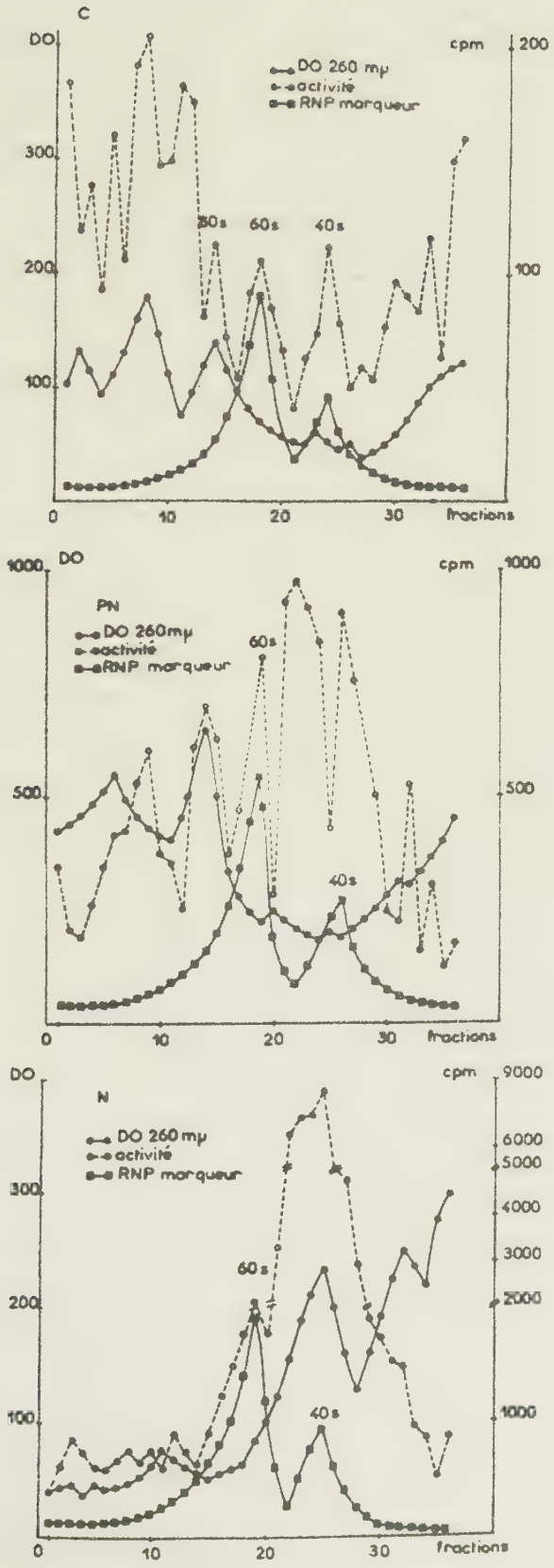


FIGURE 18 :

Sédimentation des particules RNP ribosomiques et subribosomiques cytoplasmiques (C), périnucléaires (PN) et nucléaires (N) en gradient de saccharose 15 - 30 %, après marquage de 2h à l'acide orotique ^{14}C *in vivo* (30 µC/rat).

L'avantage de cette technique réside en la séparation dans les 16 premiers tubes des fractions ribosomiques et polysomiques ($\geqslant$ 80 S) d'une part, des particules subribosomiques 60 S et 40 S d'autre part. Comme éléments de référence des pics 60 et 40 S, nous avons utilisé des sous-unités des ribosomes cytoplasmiques non marqués traités à l'EDTA avant le dépôt sur le gradient de l'ultracentrifugation extérieure (Fig.10)

L'examen des tracés de l'absorption dans l'UV à 260 mμ et de la radioactivité ainsi obtenus,nous permet d'observer la très haute activité spécifique des particules RNP nucléaires localisée au niveau du pic 40 S. Notons que les incubations effectuées au cours de cette expérience ont été réalisées en présence d'inhibiteur de la RNAse préparé à partir de surnageant post-mitochondrial et purifié selon la méthode de ROTH[147] La présence de particules nucléaires 40 S concorde avec les observations de GEORGIEV faites sur des noyaux cellulaires de foie de rat[149] selon lesquelles la majeure partie du RNA messager nucléaire (mRNA) se retrouverait dans des particules RNP homogènes ayant une constante de sédimentation de 30 S environ. Rappelons que les particules 30 S ont été observées au microscope électronique par ces auteurs, qu'elles ont des dimensions de 180 x 180 Å et contiennent 80 % de protéines et 20 % de mRNA. Ces particules s'associeraient en présence d'un taux additionnel de mRNA libre avec formation de complexes similaires, dans leur organisation générale, aux polysomes. GEORGIEV a désigné ces particules 30 S comme "informateurs" ; elles participeraient à l'enlèvement de mRNA du complexe

chromosomique et à son transfert subséquent au cytoplasme. Tout récemment, KÖHLER et ARENDS[83] ont également démontré l'existence d'un matériel particulaire, ayant un coefficient de sédimentation de 30 S environ, nettement différent de celui des particules préribosomiques 45 S trouvées dans le cytoplasme et ils suggèrent que ces particules ne se fommeraient qu'au cours de l'incubation des noyaux isolés de cellules d'animaux supérieures. MOULE et CHAUVEAU[106] ont également trouvé des particules légères de 50 S dans les noyaux cellulaires de foie de rat mais ces dernières étaient instables et montraient une stricte dépendance vis-à-vis de la concentration en Mg^{++} du milieu.

Selon d'autres auteurs, des particules protéiques serviraient à protéger le mRNA au cours de son transfert du noyau au cytoplasme ; ces particules ont été désignées sous le nom "d'informosomes"[170,114]. Ainsi l'observation de l'activité spécifique élevée des particules légères, liée aux constatations faites par nous et d'autres auteurs, plaident en faveur du rôle de ces particules dans la protection, voire le transfert du RNA messager du noyau au cytoplasme. Ces particules légères traversent la membrane nucléaire, puisque nous les retrouvons dans le milieu d'incubation des noyaux et qu'elles y forment des aggrégats semblables à ceux des polysomes. La question qui se pose est de savoir si les particules préexistent sous la forme de polysomes dans le noyau et traversent sous cette même forme la membrane nucléaire ou si les particules dissociées des aggrégats traversent la membrane et reconstituent

des structures polysomiques. La présence de polysomes dans des particules nucléaires a été plus rarement observée. WILSON et HOAGLAND[190] ont identifié la présence de disomes et ont suggéré l'existence de polysomes dans les fractions nucléaires de cellules HeLa. McCARTHY et coll.[91] ont comparé des ribosomes cytoplasmiques et nucléaires de noyaux de foie de rat, mais ont eu des difficultés pour établir fermement la présence de polysomes dans les noyaux du fait de la présence de ribonucléase intranucléaire[165].

Récemment, BYRNE et BLADEN[22] ont mis en évidence l'attachement de particules ribosomiques du mRNA tandis que ce dernier était encore attaché au DNA.

Une partie significative de mRNA nouvellement synthétisé pénètrerait selon McCONKEY et HOPKINS[92], dans le cytoplasme attaché à des sous-unités ribosomiques libres. Les résultats de ces auteurs suggèrent que la particule transportant le messager serait le ribosome lui-même.

- Etude des particules périnucléaires.

De nombreux auteurs, sur la base d'observation au microscope électronique de noyaux isolés par les méthodes usuelles, ont rapporté l'existence de ribosomes cytoplasmiques accolés à la membrane nucléaire externe. C'est pourquoi BOLBEL et POTTER[12] se servent de Triton X 100 pour enlever toutes traces de réticulum endoplasmique des noyaux. Selon PENMAN[119] il est nécessaire d'avoir recours à un mélange de composé non ionique (Tween 40) et d'un composé ionique (DOC). McCARTHY et coll.[91] ont, eux aussi, signalé la nécessité de purifier

les préparations nucléaires, mais peu d'auteurs se sont intéressés à la fraction membranaire libérée au cours de cette purification des noyaux. BACH et JOHNSON[4,5] ont isolé, au moyen d'un tampon contenant du DNA, une fraction membranaire de particules RNP à partir de noyaux de cellules HeLa lavés et traités aux détergents. Ils y ont décelé la présence d'agrégats ribosomiques ayant les caractéristiques des polysomes. Ces polysomes joueraient le rôle d'intermédiaires dans le transfert du mRNA nouvellement synthétisé du noyau au cytoplasme.

Nous avons étudié des particules subribosomiques PN et les avons comparées avec les particules subribosomiques nucléaires et cytoplasmiques après un marquage in vivo.

La figure 10 permet de constater la présence d' agrégats ayant un profil de sédimentation en gradient de saccharose semblable à celui des polysomes cytoplasmiques,aussi bien dans la membrane périnucléaire que dans le liquide extranucléaire dans lequel des noyaux lavés aux détergents ont été incubés. On trouve l'activité spécifique la plus élevée au niveau des particules nucléaires aussi bien dans la zone des polysomes que des monosomes, mais l'activité spécifique la plus forte se manifeste dans la zone des particules légères de l'ordre de 40 S. Une image similaire est obtenue lorsqu'on détermine la densité optique et les activités spécifiques au niveau de la membrane périnucléaire (Fig. 10,PN). Les polysomes et les particules légères 40 à 60 S du cytoplasme présentent les activités spécifiques les plus faibles (Fig. 10, C). Nos

résultats indiquent donc que la radioactivité des RNA des particules RNP de la membrane PN est intermédiaire entre celle du noyau et celle du cytoplasme. Il semble donc logique d'admettre que les particules nucléaires sont les précurseurs de celles du cytoplasme et que dans la membrane PN se situent les particules en voie de transfert dans le cytoplasme. Ces particules PN ne semblent pas être de simples contaminations provenant du cytoplasme, puisque leurs activités spécifiques, en particulier en ce qui concerne les particules légères de 40 S et entre 40 et 60 S, sont beaucoup plus élevées, et que le rapport des activités spécifiques dans les diverses zones des gradients des particules RNP du cytoplasme et de la membrane PN est très différent.

Rappelons que les particules PN sont attachées à la membrane périnucléaire exactement comme celles du cytoplasme au reticulum endoplasmique, et qu'elles ne sont libérées qu'après action du désoxycholate.

Il convenait, évidemment, de rechercher la nature des RNA des particules RNP PN et de la comparer à celle des RNA du noyau et du cytoplasme.

c) Etude de la sédimentation des acides ribonucléiques extraits des particules RNP cytoplasmiques, périnucléaires et nucléaires en gradient de saccharose.

L'analyse du tracé de l'absorption en U.V. et de la radioactivité du RNA des particules RNP nucléaires révèle que l'activité spécifique la plus élevée se situe au niveau du pic de RNA de 18 S, mais une radioactivité importante peut être

FIGURE 11 :

Sédimentation des RNA extraits des ribosomes nucléaires (N) de foie de rat, après marquage de 2h à l'acide orotique ^{14}C *in vivo* (20 µC/rat). Centrifugation en gradient de saccharose 5 - 20 % pendant 16h à 12.000 tours/min. dans un rotor SW25.1 à l'ultracentrifugeuse Spinco L2.

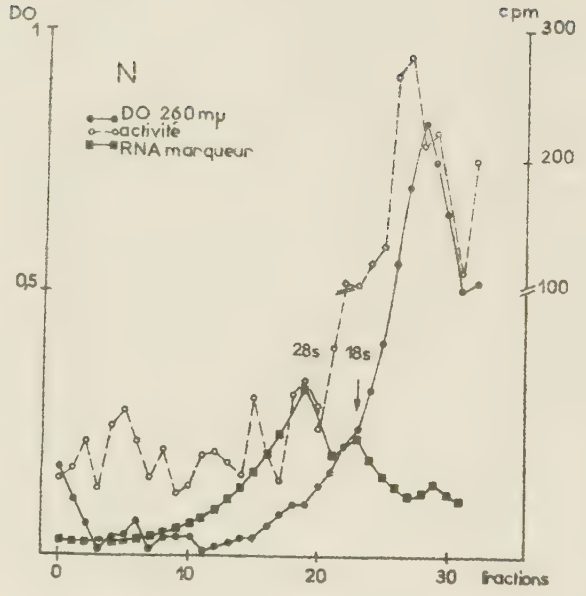
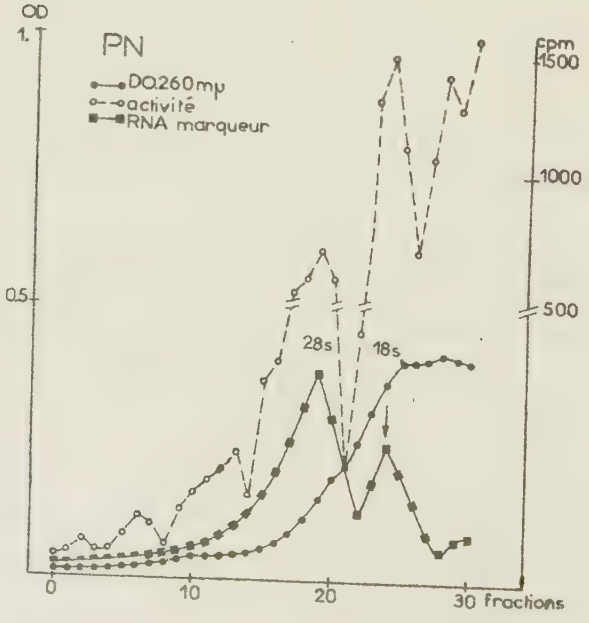


FIGURE 13 :

Profils de sédimentation des RNA extraits des particules périnucléaires (PN) de foie de rat, après marquage de 2h à l'acide orotique ^{14}C *in vivo* (20 µC/rat). Centrifugation en gradient de saccharose 5-20 % pendant 16h à 18.000 tours/min. dans un rotor SW 25.1 à l'ultracentrifugeuse Spinco L2.



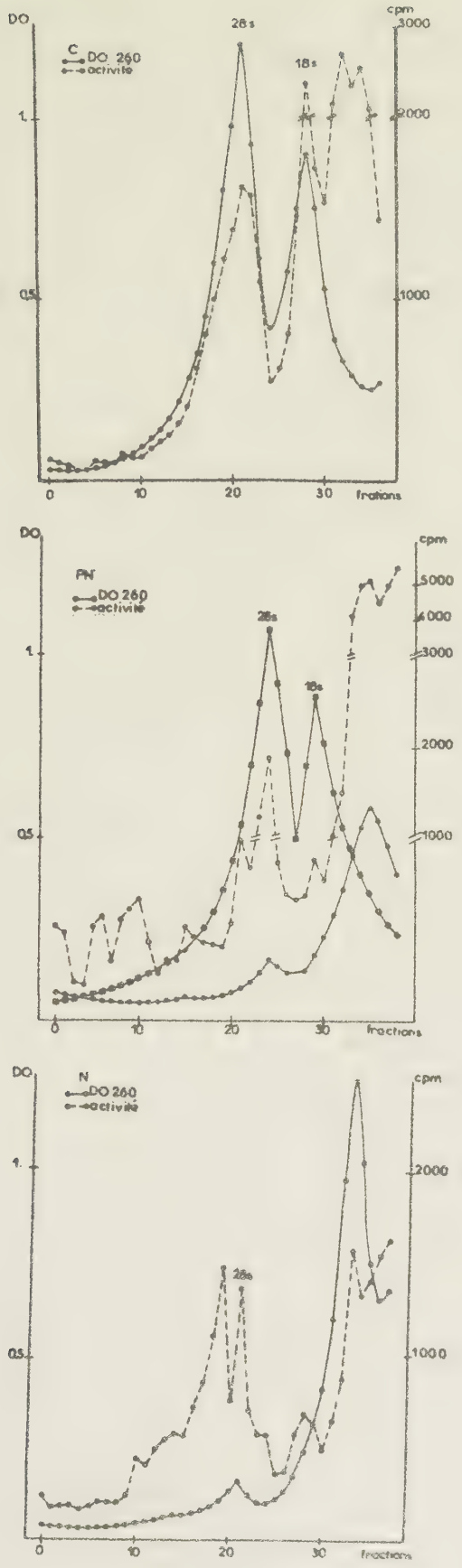


FIGURE 12 :

Profils de sédimentation des RNA extraits des particules RNP cytoplasmiques (C), périnucléaires (PN) et nucléaires (N) après marquage de 2h à l'acide orotique ^{14}C *in vivo* (30 µC/rat). Centrifugation des RNA en gradient de saccharose 5 - 20 % pendant 16h à 18.000 tours/min. dans un rotor SW 25_1 à l'ultracentrifugeuse Spinco L.

- Absorption à 260 mµ
- Radioactivité en coups/min.
- RNA marqueur

détectée dans la zone des RNA lourds (Fig.11). La présence de quantités relativement importantes dans la zone légère indique une dégradation qui s'effectue soit durant la préparation des noyaux, soit plus probablement pendant l'incubation des noyaux sous l'effet des ribonucléases nucléaires. C'est pourquoi, nous avons isolé et purifié, selon la technique de ROTH, l'inhibiteur de la ribonucléase décrit par divers auteurs[12,87,147,174] et avons préparé les fractions PN d'une part,et nucléaires d'autre part, en présence de cet inhibiteur. Les résultats ainsi obtenus sont représentés dans la figure 12N et PN.

On note que les activités spécifiques des RNA des particules nucléaires sont beaucoup plus élevées que dans l'expérience précédente (Fig. 11), en particulier dans la zone des RNA plus lourds (28 S environ). Il en est de même pour les RNA de la fraction PN. Notons qu'on a pu éviter totalement la dégradation (Fig. 12 PN et 13), ceci s'explique par le fait que l'on a employé un inhibiteur évitant ainsi la dégradation. Ce fait indique qu'il s'agissait d'un RNA facilement dégradé, ce qui est surtout le cas de polyribonucléotides à un brin. L'on peut également observer que l'activité spécifique des RNA ribosomiques cytoplasmiques dans cette même expérience ,était nettement inférieure à celles des RNA périnucléaires et nucléaires ; de plus on a pu constater l'absence de RNA lourd au-delà de 28 S présent dans le noyau et la membrane périnucléaire. Cette dernière constatation pourrait suggérer un transfert des RNA polycistroniques, mais il est également possible qu'il s'agisse dans ce cas de RNA géants précurseurs des RNA

ribosomiques et messagers. La présence d'un tel RNA dans la membrane PN signifierait alors que la dégradation du RNA géant postulée par HARRIS[58] et confirmée par McCARTHY et coll.[90], ainsi que par JACOB et coll.[75], peut se situer au niveau de la membrane nucléaire. Une telle interprétation serait également en accord avec les hypothèses de HILL et ERRERA[60] selon lesquelles la fraction de RNA à haut poids moléculaire, polydisperse, peut être constituée,soit par des chaînes de mRNA, soit par des RNA préribosomiques d'origine nucléolaire. Le profil de RNA géant ne peut pas être dû à un phénomène d'agrégation, du fait que nous avons opéré en l'absence de Mg^{++} et avec une force ionique très faible.

Parallèlement au RNA particulaire du noyau et de la membrane PN, nous avons analysé la sédimentation en gradient de saccharose du RNA du surnageant de ces particules déposées à 105.000 g (Fig. 14). Les essais ont été effectués comme précédemment en présence d'inhibiteur de la ribonucléase. On notera que, dans le cas du surnageant des particules RNP nucléaires, on retrouve le RNA polydisperse ; il s'agit d'un RNA de haut poids moléculaires (> 28 S) de même que de RNA à très haute activité spécifique dans la zone située entre 18 S et 4 S. Le RNA du surnageant de la fraction membranaire est également polydisperse et contient aussi du RNA de type géant de coefficient de sédimentation supérieur à 28 S ainsi que du RNA se situant dans la zone désignée pour le mRNA.

La signification de ces RNA reste cependant à préciser. On retiendra seulement un certain parallèlisme entre le RNA

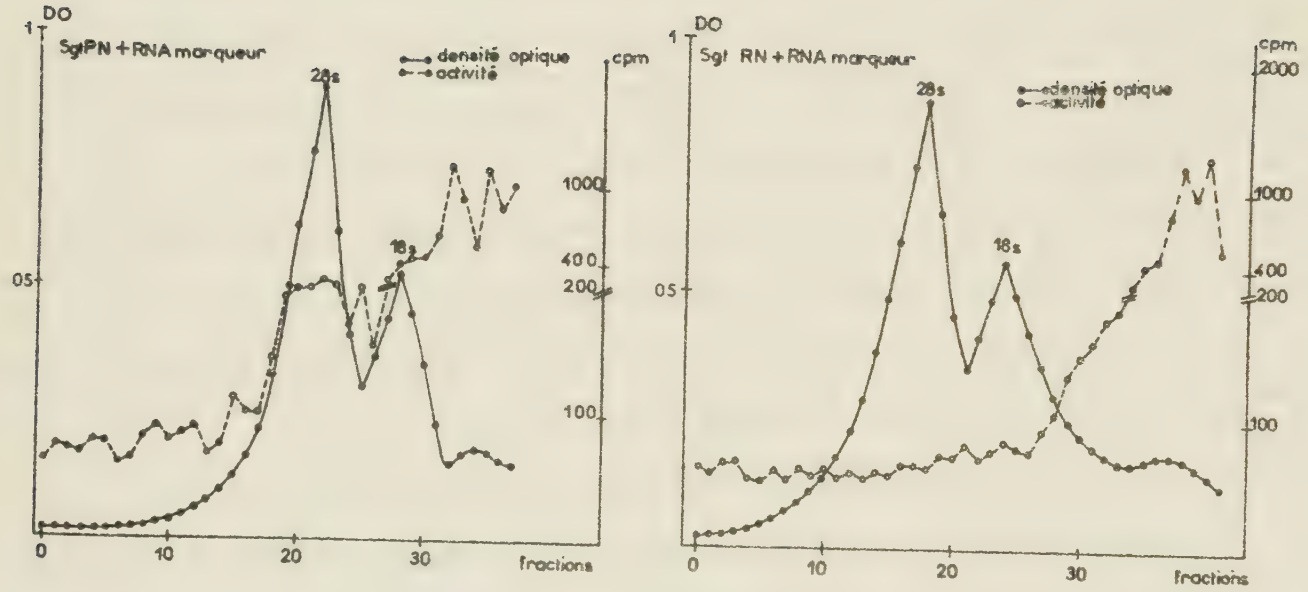


FIGURE 14 :

Sédimentation des RNA extraits des surnageants 105.000 g des particules RNP périnucléaires (PN) et des ribosomes nucléaires (RN) de foie de rat, après marquage de 2h à l'acide orotique ^{14}C *in vivo* (30 µC/rat). Centrifugation des RNA en gradient de saccharose 5-20 % pendant 16h à 18.000 tours/min. dans un rotor SW 25$_1$ à la Spinco L.

nucléaire et le RNA PN et le fait que les RNA géants n'apparaissent pas dans le cytoplasme.

Afin d'avoir plus de précision sur la nature des RNA que nous venons d'étudier, on a procédé à l'analyse de leur compositions centésimale en nucléotides.

C. Analyse de la composition centésimale en nucléotides des RNA des fractions ribonucléoprotéiques périnucléaires et nucléaires.

Après traitement de la fraction membranaire périnucléaire au DOC, les particules périnucléaires recueillies après centrifugation à 105.000 g sont soumises à une sédimentation en gradient de saccharose 15 - 30 % selon la méthode de JOKLIK et BECKER[76] décrite dans la partie "Méthodes". Cette centrifugation a pour but de faire sédimenter le plus possible les particules lourdes et dégager les particules de 60 à 40 S. La distribution de la densité optique obtenue dans ce cas est représentée dans la figure 15. On a ainsi pu séparer les particules lourdes et légères en vue d'une étude de la distribution des bases dans leur RNA. Pour ce faire, les particules ont été soumises à une hydrolyse alcaline qui permet de libérer les ribonucléotides ; les quatre types de nucléotides ont été séparés par chromatographie sur colonne de Dowex (Fig. 16), selon la technique de PETROVIC[127] décrite dans les "méthodes". Parallèlement, on a étudié la composition en bases des RNA des particules et de la fraction non sédimentable qui passent du noyau dans un milieu d'incubation.

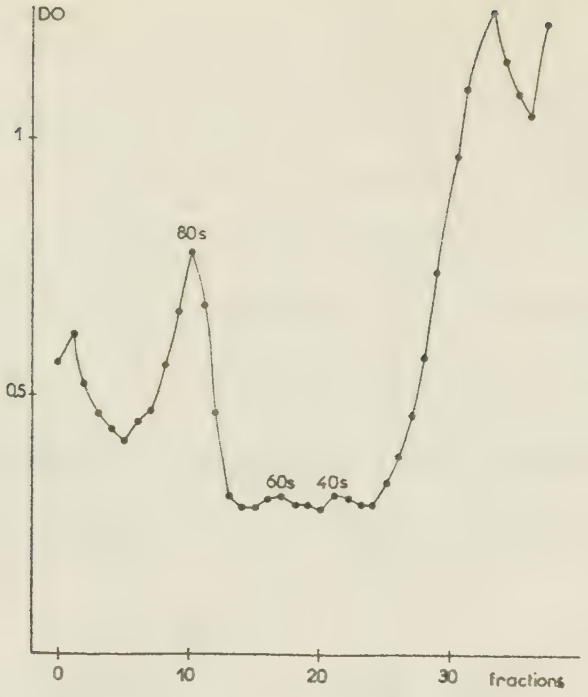


FIGURE 15 : Profil de sédimentation des particules ribosomiques (⩾ 80 S) et subribosomiques (⩽ 80 S) des particules RNP périnucléaires en gradient de saccharose 15 - 30 %.

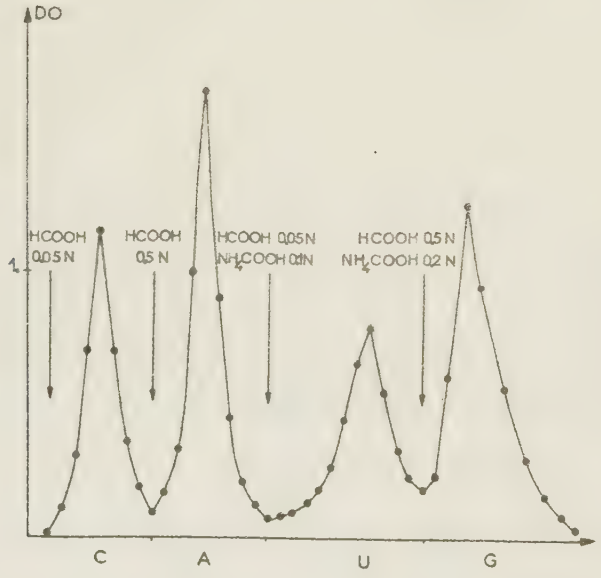


FIGURE 16 : Exemple de séparation des ribonucléotides des RNA des particules RNP périnucléaires, par chromatographie sur colonne de Dowex 1 X 8, selon la technique décrite dans le chapître "Méthodes".

TABLEAU VIII

DETERMINATION DE LA COMPOSITION CENTESIMALE EN NUCLEOTIDES DES PARTICULES RIBONUCLEOPROTEIQUES PERINUCLEAIRES ET NUCLEAIRES

	Fraction périnucléaire			Fraction nucléaire	
	Particules PN totales	Particules PN lourdes	Particules PN légères	Fraction soluble	Fraction sédimentable
C	27,9	28,7	28,0	26,9	27,7
A	19,9	18,3	20,2	17,4	18,1
U	26,4	23,7	31,8	28,9	26,4
G	25,8	29,3	20,0	26,8	27,8
G+C/A+U	1,16	1,37	0,92	1,16	1,25

Il ressort des résultats réunis dans le tableau VIII que les particules légères périnucléaires ont un rapport G+C/A+U peu éloigné de celui du mRNA mais ont un faible taux de A et de G et un taux élevé de C et de U qui s'expliquerait par la présence d'un mélange de RNA ribosomique et messager et peut-être également d'homopolymères. En ce qui concerne les RNA des particules RNP de la fraction lourde de la membrane PN, le rapport G+C/A+U se rapproche de celui bien connue des ribosomes cytoplasmiques qui est de 1,65. Le RNA de la fraction lourde PN correspond donc essentiellement à du RNA ribosomique.

Le RNA de l'ensemble des particules PN possède un rapport G+C/A+U égal à 1,16 plus proche de celui du RNA messager que du RNA ribosomique, ce qui suggère que cette fraction est hétérogène et contient aussi bien du RNA ribosomique que du RNA messager, et peut-être également des homopolyribonucléotides.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par l'étude de l'incorporation d'un précurseur radioactif dans le RNA extrait des particules PN. Nous avions noté la présence de RNA polydisperse, à haut poids moléculaire, marqué relativement rapidement et qui présente les caractéristiques attribuées au mRNA.

Nous n'avons pu fournir la preuve directe par l'hybridation à saturation étant donné que les activités spécifiques obtenues étaient trop faibles pour la réalisation d'une telle expérience. De même, des expériences de stimulation d'une synthèse protéique acellulaire, n'ont pas été tentées, car il semble bien qu'une telle synthèse ne peut être dirigée à l'aide d'un RNA purifié d'origine animale.

L'analyse des RNA nucléaires qui quittent le noyau au cours de l'incubation indique la présence aussi bien dans la fraction sédimentable que dans la fraction non sédimentable des rapports G+C/A+U qui correspondent à un mélange de RNA ribosomique et de RNA de composition en bases semblable à celle du DNA. Ceci confirme encore les résultats rapportés plus haut concernant le marquage et la sédimentation en gradient de saccharose de ces RNA. Rappelons que la présence de mRNA

dans la fraction nucléaire diffusible soluble a également été mise en évidence par MONTREUIL et coll.[35] après incubation des noyaux de foie dans un tampon phosphate contenant du saccharose. Cet auteur signale également un rapport G+C/A+U égal à 1,0. Tout récemment MONTREUIL et coll. suggèrent que les mRNA diffusent sous une forme conjuguée à des RNA de type ribosomique.

D) Incorporation de leucine ^{14}C dans les protéines des particules ribonucléoprotéiques cytoplasmiques, périnucléaires et nucléaires.

Les animaux ont reçu 100 µCi de leucine ^{14}C et ont été sacrifiés au bout de 2 h. Le profil de radioactivité représenté dans le graphique 8-B (Leu ^{14}C-C-PN et N) indique la présence de protéines néosynthétisées au niveau des polysomes et monosomes, ainsi que dans la zone se situant en deça du pic 18 S. L'existence de protéines marquées dans la zone des particules légères pourrait correspondre à des protéines libérées après la synthèse au niveau des polysomes.

On note également une incorporation moins active de leucine ^{14}C dans les particules appartenant à la membrane PN dans la région des polysomes et des particules légères 40 S, comparativement au cytoplasme. Dans le noyau l'incorporation des acides aminés dans les protéines est la plus faible. Compte tenu des hypothèses formulées concernant le transport de mRNA par des particules protéiques, on peut se demander si un tel phénomène est compatible avec la synthèse très discrète de protéines que nous observons dans le noyau. Le fait que les

activités spécifiques des protéines soient plus considérables dans la membrane périnucléaire pourrait indiquer qu'une synthèse protéique plus active a lieu au niveau des polysomes que nous y avons mis en évidence.

On ne saurait dire cependant s'il s'agit au niveau des polysomes PN d'une synthèse protéique plus intense complémentaire de celle qui interviendrait dans le phénomène de détachement du mRNA synthétisé au niveau des chromosomes.

Une dernière hypothèse mérite encore d'être évoquée, celle d'une synthèse protéique au niveau du cytoplasme avec transfert dans le noyau où s'effectue l'attachement au mRNA. Une telle démonstration appelle des expériences relativement complexes que nous n'avons pu réaliser jusqu'à présent.

C O N C L U S I O N S

Les travaux de REVEL et WINTZERITH[137] sur la régulation de la biosynthèse des acides ribonucléiques ont suggéré l'importance de l'adénosine-triphosphate-nucléaire dans le mécanisme de régulation qui oriente les synthèses soit vers la formation de nicotinamide-adénine-dinucléotide(NAD), soit vers la production d'acides ribonucléiques (RNA). Ces auteurs avaient signalé que cette corrélation RNA-NAD s'observait dans le noyau cellulaire et ont émis l'hypothèse qu'il existerait un équilibre basé sur l'utilisation compétitive des composés à adénine pour la formation des RNA et NAD. Il se posait dès lors le problème de l'origine des nucléotides nucléaires nécessaires à ces biosynthèses.

En adoptant comme test la synthèse intranucléaire de NAD à partir de NMN et d'ATP provenant d'un milieu extranucléaire, nous avons pu démontrer que la fraction AMP de l'ATP est transportée en bloc dans le noyau.

Nous avons observé, pour les noyaux incubés in vitro, qu'en présence de NMN, et sans apport d'ATP exogène, le "pool" des nucléotides nucléaires était insuffisant pour permettre une biosynthèse de NAD. Il a été également vérifié que, dans nos conditions d'incubation, la nicotinamide-adénine-dinucléotide pyrophosphorylase qui synthétise le NAD, n'est pas

libérée dans le milieu extranucléaire et que la biosynthèse de NAD est bien intranucléaire.

L'étude comparée de la biosynthèse de NAD, par des noyaux cellulaires de divers organes incubés in vitro, a également permis de montrer des différences d'aptitude à réaliser cette synthèse dans divers noyaux.

On a ainsi observé que les biosynthèses de NAD étaient plus intenses dans les noyaux cellulaires du cerveau que dans ceux du foie ; ceci est en bon accord avec la notion bien admise du niveau très élevé de la respiration et des phosphorylations oxydatives dans le cerveau.

A côté de la synthèse de NAD, la biosynthèse de RNA constitue une des fonctions essentielles du noyau. Nous nous sommes intéressé au transfert des RNA, après leur synthèse, du noyau dans le cytoplasme in vitro, soit après marquage préalable des RNA in vivo, soit en mettant en oeuvre l'incorporation de précurseurs radioactifs au cours de l'incubation des noyaux isolés.

Nous avons précisé le rôle des ions Mg^{++} dans le maintien des RNA à l'intérieur des noyaux cellulaires au cours de leur incubation in vitro. Il a été établi qu'un taux de Mg^{++} compris entre 0,025 M et 0,050 M, réduit considérablement la sortie des acides nucléiques du noyau ; à des taux inférieurs ou supérieurs on note une fuite des acides nucléiques dans l'espace

extranucléaire. Il est judicieux d'admettre que les ions Mg^{++} jouent un rôle fondamental dans la régulation de la perméabilité de la membrane nucléaire aux acides nucléiques.

L'analyse de la cinétique de diffusion des acides nucléiques dans le milieu extranucléaire a suggéré l'existence de deux types de transfert de RNA vers le milieu extérieur, l'un caractérisé par une vitesse rapide, l'autre par une cinétique beaucoup plus lente.

La forme des acides nucléiques quittant le noyau au cours de l'incubation in vitro, a été recherchée. Nous avons constaté que, dans les conditions optimales d'incubation, 70% du RNA qui passent dans l'espace extranucléaire se trouvent sous une forme particulaire. L'existence de ces particules ribonucléoprotéiques d'origine nucléaire a été prouvée :

- par leur profil de sédimentation analogue à celui des particules RNP cytoplasmiques, ce qui indique la présence d'agrégats semblables aux polysomes.

- par l'action de l'EDTA qui dissocie les agrégats des particules ribonucléoprotéiques qui apparaissent dans le milieu extranucléaire, de la même manière que pour les polysomes.

Des particules semblables aux sous-unités ribosomiques ont pu être mises en évidence dans ces conditions.

L'inhibition par l'actinomycine de la synthèse de RNA dans les noyaux incubés in vitro empêche l'apparition de formations polysomiques dans le milieu extranucléaire.

Seule une petite partie des polysomes qui apparaissent dans le milieu extranucléaire, provient de la membrane périnucléaire. L'apparition de polysomes semble donc conditionnée par une synthèse active de mRNA dans le noyau qui s'associe aux ribosomes, soit dans le noyau même, soit après passage individuel des ribosomes et du mRNA. Toutefois, l'éventualité que l'actinomycine empêche des polysomes, préexistants dans le noyau, de passer dans le milieu extranucléaire, n'est pas exclue.

La mise en évidence, par la microscopie électronique de la présence de particules ribosomiques attachées à la membrane extranucléaire, nous a conduit à rechercher leur signification. Pour ce faire, la membrane périnucléaire a été détachée par traitement aux détergents, et la nature des particules qui s'y trouvent a été analysée.

Le profil de sédimentation en gradient de saccharose des particules ribonucléoprotéiques de la membrane périnucléaire, après traitement de celle-ci par le DOC, a révélé l'existence de formations semblables à celles des polysomes cytoplasmiques à côté de particules légères à constante de sédimentation de 60 S et de 40 S. La sédimentation du RNA de ces particules périnucléaires et l'analyse des bases, permettent d'envisager deux éventualités :

1) la présence de particules ribosomiques associées au RNA messager ;

2) la présence simultanée de sous-unités ribosomiques et de particules transportant le RNA messager dans le cas des particules légères.

L'étude cinétique du marquage des particules ribonucléoprotéiques du noyau, de la membrane périnucléaire et du cytoplasme, révèle l'existence de gradients décroissants d'activité spécifique dans ces particules. Ceci suggère que les particules de la membrane périnucléaire représentent une étape intermédiaire dans la migration des particules nucléaires vers le milieu extranucléaire et que, déjà dans la membrane périnucléaire, les polysomes sont constitués. Mais il existe, également, dans la membrane périnucléaire, des particules légères. S'agit-il d'artéfacts consécutifs à la dégradation des polysomes par les nucléases, ou d'une présence réelle de particules légères migrant individuellement? Il ne nous a pas été possible de répondre à cette question. Au cas où l'on admettrait que le mRNA est fixé sur des protéines, au moment où, la biosynthèse terminée, il se détache des chromosomes, il conviendrait d'admettre une synthèse complémentaire de protéines dans la membrane périnucléaire. Toutefois, l'éventualité que la synthèse des protéines intervient dans le cytoplasme et que celles-ci contribuent ensuite à la formation de la fraction protéique des polysomes périnucléaires et des particules à RNA messager du noyau, n'est pas exclue, étant donné les gradients décroissants des activités spécifiques des protéines allant du cytoplasme vers le noyau.

BIBLIOGRAPHIE

1. ALLFREY, V.G., MIRSKY, A.E., et OSAWA, S.J., J. Gen. Physiol., 1957, 40, 451.
2. AMANO, M., Expt. Cell Research, 1967, 46, 169.
3. ATKINSON, M.R., JACKSON, J.F. et MORTON, R.K., Nature, 1961, 192, 946.
4. BACH, M.K., et JOHNSON, H.G., Nature, 1966, 209, 893.
5. BACH, M.K. et JOHNSON, H.G., Biochemistry, 1967, 6, 1916.
6. BEERMANN, W., Am. Zoologist., 1963, 3, 23.
7. BEHRENS, M., Zeit. Physiol. Chem., 1932, 209, 59.
8. BERGERON-BOUVET, C., MOULE, Y., B.B.A., 1966, 123, 617.
9. BETEL, I. et KLOUWEN, H.M., B.B.A., 1963, 76, 327.
10. BERGSTRAND, A., ELIASSON, N.A., HAMMARSTEN, E., NORBERG, B., REICHARD, P. et VON UBISCH, H., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1948, 13, 22.
11. BEVILACQUA, L., VACCARI, L. et CONTE, G., Boll. Soc. Ital Biol. Sper., 1951, 27, 1249.
12. BLOBEL, G. et POTTER, V.R., PNAS, 1966, 55, 1283, Science 1965, 154, 1662.
13. BOCK, R.M., NAN-SING, L., MORELL, S.A., LIPTON, S.H., Arch Bioch. Biophys., 1956, 62, 253.
14. BORNENS, M., C.R.Acad.Sc.Paris, 1968, 266, 596.
15. BRACHET, J., Arch. Biol., 1942, 53, 207.

16. BRANSTER, M.J. et MORTON, R.K., B.J., 1956, 63, 640, Nature, 1961, 181, 540.

17. BREITMAN, T.R. et WEBSTER, G.C., Nature, 1959, 184, 637.

18. BRENNER, S., JACOB, F. et MESELSON, M., Nature, 1961, 190, 576.

19. BRITTEN, R.J. et ROBERTS, R.B., Science, 1960, 131, 32.

20. BURTON, K., B.J., 1956, 62, 315.

21. BUTLER, J.A.V. et GODSON, G.N., Nature, 1964, 201, 876.

22. BYRNE, R., LEVIN, J.G., BLADEN, H.A. et NIRENBERG, M.W., PNAS, 1964, 52, 140.

23. CAMPBELL, P.N., HANSEN, G.S., LOWE, E., B.J., 1965, 97, 422.

24. CARVACHO, A.P., SANUI, H., PACE, N., J Cell Comp. Physiol. 1965, 66, 57.

25. CASPERSSON, T.O., Cell growth and Cell function, 1950, WW. NORTON & C°, New York,125 pages.

26. CHAMBON, P., MANDEL, P., Bull. Soc. Chim. Bio, 1959, 41, 715.

27. CHAPEVILLE, F., LIPMANN, F., VON EHRENSTEIN, G., WEISBLUM, B., RAY, W.J. et BENZER, S., PNAS, 1962, 48, 1086.

28. CHAUVEAU, J., MOULE, Y. et ROUILLER, C., Exp. Cell Research, 1956, 11, 317.

29. CIOTTI, M.M. et KAPLAN, N.O., Methods in Enzymology, III, 890, Acad. Press, N.Y.

30. CLARK, J.B., GREENBAUM, A.L., Mc LEAN, P., B.J., 1966, 98, 546.

31. COHN, W.E., J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 1471, J. Cell Comp. Physio., 1951, 38, 21.

32. COLOWICK, P.S., KAPLAN, N.O., CIOTTI, M.M., JBC, 1951, 191, 447.

33. CROSSMAN, G., Science, 1937, 85, 250.

34. DABEVA, M.D., TSANEV, R.G., Analytic. Biochem., 1966, 17, 390.

35. DEFERT-KOBUS, W., SEGARD, E. et MONTREUIL, J., Bull. Soc. Chim. Bio., 1965, 47, 2293.

36. DEFERT-KOBUS, W., KERCKAERT, J.P., SEGARD, E., MONTREUIL, J., C. R. Acad. Sc. Paris, 1968, 266, 31.

37. DESMOND, E.M. et TEDESCHI, H., J. of Cell Biol., 1967, 35, 32A.

38. DIETRICH, L.S., FULLER, L., YERO, I.L., MARTINEZ, L., J.B. C., 1966, 241, 188.

39. DISCHE, Z., Mikrochemie, 1930, 2, 4.

40. DOUNCE, A.L., JBC, 1943, 187, 685.

41. DUVE (DE), C., PRESSMAN, B.C., GIANETTO, R., WATTIAUX, R. et APPELMANS, F., B.J., 1955, 60, 604.

42. EDELMAN, S.I., TS'O, P.O.P. et VINOGRAD, J., B.B.A., 1960, 43, 393.

43. FAWCETT, D.W., J. Nat. Cancer Inst., 1955, 15 (suppl.), 1475.

44. FLAMM, W.G. et BIRNSTIEL, M.L., B.B.A., 1964, 87, 101.

45. FRENSTER, J.H., ALLFREY, V.G. et MIRSKY, A.E., PNAS, 1960, 46, 432.

46. GEORGIEV, G.P. et MANT'EVA, V.L., Biokhimiya, 1961, 26, 143.

47. GEORGIEV, G.P., SAMARINA, O.P., LERMAN, M.I., SMIRNOV, M.V., Nature, 1963, 200, 1291.

48. GEORGIEV, G.P., Progr. in N. A. Research, 1967, 6, 259.

49. GHOLSON, R.K., Nature, 1966, 212, 933.

50. GIACOMONI, D. et SPIEGELMAN, S., Science, 1962, 138, 1328.

51. GILL, D.M., J. of Cell Biol., 1965, 24, 157.

52. GIRARD, M., LATHAM, H., PENMAN, S., DARNELL, J.E., J.M.B., 1965, 11, 187.

53. GODSON, G.N., et BUTLER, J.A.V., B.J., 1964, 93, 573.

54. GOLDBERG, A., J.M.B., 1966, 15, 663.

55. GOODMAN, H. et RICH, A., PNAS, 1962, 48, 2101.

56. GOODMAN, H. et RICH, A., Nature, 1963, 199, 318.

57. GROS, F., GILBERT, W., HIATT, H.H., KURLAND, C.G., RISEBROUGH, R.W. et WATSON, J.D., Nature, 1961, 190, 581.

58. HARRIS, H., Progr. Nucl. Ac. Res., Ed. J.N. DAVIDSON et W.E. COHN, Publ. Acad. Press, 1963, II, 19.

59. HENSHAW, E.C., REVEL, M. et HIATT, H.H., J.M.B., 1965, 14, 241.

60. HILL, M., MILLER FAURES, A., ERRERA, M., B.B.A., 1964, 80, 39.

61. HNILICA, L.S., Progr. Nucl. Ac. Res., 1967, 7, 25.

62. HOAGLAND, M.B., STEPHENSON, M.L., SCOTT, J.F., HECHT, L., ZAMECNIK, P., JBC, 1958, 231, 241.

63. HOGEBOOM, H. et SCHNEIDER, W.C., JBC, 1952, 197, 611.

64. HOGEBOOM, H. et SCHNEIDER, W.C., The Nucleic Acids, Ed.

Chargaff E. et Davidson J.N., Publ. Acad. Press, N.Y., 1955, 2, 199.

65. HOLTZMAN, E., SMITH, I., PENMAN, S., J.M.B., 1966, 17, 131.

66. HOLZER, H., SEDLMAYER, G., KIESE, M., Bioch. Zeit., 1956, 328, 276.

67. HOLZER, H. et KROGER, H., Bioch. Zeit., 1958, 330, 579.

68. HUBERT, M.T., FAVARD, P., CARASSO, N., ROZENCWAIJG, R., ZALTA, J.P., J. Micr., 1962, 1, 435.

69. HURLBERT, R.B., SCHMITZ, H., BRUMM, A.G., POTTER, V.R., J.B.C., 1954, 209, 23.

70. HURWITZ, J., FURTH, J.J., ANDERS, H., ORTIZ, P.J., AUGUST, J.T., Cold Spring Harbor Symposia, 1961, 26, 91.

71. HURWITZ, J., FURTH, J.J., MALAMY, M. et ALEXANDER, M., PNAS, 1962, 48, 1222.

72. HYMER, W.C. et KUFF, E.L., B.B.R.C., 1964, 15, 506.

73. IJICHI, H., ICHIYAMA, A. et HAYAISHI, J.B.C., 1966, 241, 3701.

74. JACOB, F. et MONOD, J., J.M.B., 1961, 3, 318.

75. JACOB, M., STEVENIN, J. et MANDEL, P., C. R. Acad. Sc. Paris, 1968, 266, série D, 1675.

76. JOKLIK, W.K. et BECKER, Y., J.M.B., 1965 a, 13, 496.

77. KAPLAN, N.O., J.B.C., 1956, 219, 287.

78. KARJALAINEN, E., Acta Chemica Scand., 1966, 20, 586.

79. KEMPF, J. et MANDEL, P., Bull. Soc. Chimie Biol. (sous presse).

80. KIRBY, K.S., B.B.A., 1960, 40, 193.

81. KLETHI, J., MANDEL, P., B.B.A., 1957, 24, 642.

82. KODAMA, R.M. et TEDESCHI, H., J. of Cell Biol., 1963, 18, 541.

83. KÖHLER, K. et ARENDS, S., C. R. Ac. Sc. Paris, 1968, 266, 170.

84. KORNBERG, A., J.B.C., 1950, 182, 779.

85. KORNER, A., B.J., 1961, 81, 168.

86. KREBS, H.A., BARTLEY, W., GRIFFITHS, D.E. et STOCKEN, L.A., Biochemisches Taschenbuch, Springer Verlag, Berlin, 1964, II, 522.

87. LAWFORD, G.R., LANGFORD, P. et SCHACHTER, H., J.B.C., 1966, 241, 1835.

88. LAWFORD, G.R., SADOWSKI, P. et SCHACHTER, H., J.M.B., 1967, 28, 81.

89. LEE, H.J. et HOLBROOK, D.J., Arch. Bioch. and Biophys., 1964, 108, 275.

90. LOGAN, R., FICQ, A., ERRERA, M., B.B.A., 1959, 31, 402.

91. Mc CARTHY, K.S., PARSONS, J.T., CARTER, W.A., LAZLO, J., J.B.C., 1966, 241, 5489.

92. Mc CONKEY, E.H. et HOPKINS, J.W., J.M.B., 1965, 14, 257.

93. Mc DONALD, J.W.D. et STEWART, H.B., Canadian J. of Biochemistry, 1967, 45, 363.

94. Mc EWEN, B.S., ALLFREY, V.G., MIRSKY, A.E., J.B.C., 1963, 238, 758.

95. Mc GREGOR, R.R. et MAHLER, H.R., Arch. Bioch. Biophys., 1967, 120, 136.

96. MAGGIO, R., SIEKEVITZ, P. et PALADE, G.E., J. Cell Biol., 1963, 18, 267.

97. MANDEL, P., Bull. Soc. Chimie Biol., 1959, 41, 173.

98. MANDEL, P., WINTZERITH, M., KLEIN-PETE, N. et MANDEL, L., Nature, 1963, 198, 1000.

99. MANDEL, P., Bull. Soc. Chimie Biol., 1967, 49, 1491.

100. MARTIN, R.G., AMES, B.N., J.B.C., 1961, 236, 1372.

101. MAZIA, D. et PRESCOTT, D.M., B.B.A., 1955, 17, 23.

102. MEJBAUM, W., Z. Physiol. Chem., 1937, 258, 117.

103. MERITS, I., B.B.R.C., 1963, 10, 254.

104. MIESCHER, F., Hoppe-Seylers medizinisch - chemische Untersuchungen, 1871, 4, 441.

105. MINARD, F.N. et HAHN, G.H., J.B.C., 1963, 238, 2474.

106. MIRSKY, H.E. et POLLISTER, A.W., J. Gen. Physiol., 1946, 30, 101 et 117.

107. MONTREUIL, J. et SEGARD, E., C. R. Acad. Sc., 1961, 252, 4217.

108. MORTON, R.K., Nature, 1958, 181, 540.

109. MOULE, Y. et CHAUVEAU, J., C. R. Acad. Sc., 1966, 263, 75.

110. MUNRO, A.J., JACKSON, R.J., KORNER, A., B.J., 1964, 92, 289.

111. MURUMATSU, M. et BUSCH, H., J.B.C., 1965, 240, 3960.

112. NAKAMURA, Sh., NISHIZUKA , Y. et HAYAISHI, O., J.B.C., 1964, 239, PC 2717.

113. NAORA, H. et TAKEDA, S., B.B.A., 1954, 13, 360.

114. NEMER, M. et INFANTE, A.A., Fed. Proc., 1965, 24, N°2, Part 1, 283.

115. NOLL, H., STAEHELIN, T. et WETTSTEIN, F.O., Nature, 1963, 198, 632.

116. OCHOA, S., BURMA, D.P., KRÖGER, H. et WEILL, J.D., PNAS, 1961, 47, 670.

117. OSAWA, S., ALLFREY, V.G. et MIRSKY, A.E., J. Gen. Physiol. 1957, 40, 491.

118. OSAWA, S., TAKATA, K. et HOTTA, Y., B.B.A., 1958, 28, 271.

119. PENMAN, S., J.M.B., 1966, 17, 117.

120. PENMAN, S., SMITH, I. et HOLTZMAN, E., Science, 1966, 154, 786.

121. PENNIALL, R., SHIH-MIN, L. et SAUNDERS, J.P., B.B.A., 1966, 76, 170.

122. PERRY, R.P., Exp. Cell Res., 1960, 20, 216.

123. PERRY, R.P., PNAS, 1962, 48, 2179.

124. PERRY, R.P. et KELLEY, D.E., J.M.B., 1966, 16, 255.

125. PERRY, R.P., Progr. in N. A. Res., 1967, 6, 219.

126. PETERMANN, M.L., J.B.C., 1960, 235, 1996.

127. PETERMANN, M.L., The physical and chemical properties of ribosomes, Elsevier Publ. Co., 1964, 113.

128. PETROVIC, S. et JANKOVIC, V., Bull. of the Boris Kidrich Inst. of Nuclear Sciences, 1963, 13, 47.

129. PETROVIC, S., BECAREVIC, A. et PETROVIC, J., B.B.A., 1965, 95, 518.

130. PHILPOT, J.St.L. et STANIER, J.E., B.J., 1956, 63, 214.

131. POGO, A.O., POGO, B.G.T., LITTAU, V.C., MIRSKY, A.E., HAMILTON, M.G., B.B.A., 1962, 55, 849.

115. NOLL, H., STAEHELIN, T. et WETTSTEIN, F.O., Nature, 1963, 198, 632.

116. OCHOA, S., BURMA, D.P., KRÜGER, H. et WEILL, J.D., PNAS, 1961, 47, 670.

117. OSAWA, S., ALLFREY, V.G. et MIRSKY, A.E., J. Gen. Physiol. 1957, 40, 491.

118. OSAWA, S., TAKATA, K. et HOTTA, Y., B.B.A., 1958, 28, 271.

119. PENMAN, S., J.M.B., 1966, 17, 117.

120. PENMAN, S., SMITH, I. et HOLTZMAN, E., Science, 1966, 154, 786.

121. PENNIALL, R., SHIH-MIN, L. et SAUNDERS, J.P., B.B.A., 1966, 76, 170.

122. PERRY, R.P., Exp. Cell Res., 1960, 20, 216.

123. PERRY, R.P., PNAS, 1962, 48, 2179.

124. PERRY, R.P. et KELLEY, D.E., J.M.B., 1966, 16, 255.

125. PERRY, R.P., Progr. in N. A. Res., 1967, 6, 219.

126. PETERMANN, M.L., J.B.C., 1960, 235, 1996.

127. PETERMANN, M.L., The physical and chemical properties of ribosomes, Elsevier Publ. Co., 1964, 113.

128. PETROVIC, S. et JANKOVIC, V., Bull. of the Boris Kidrich Inst. of Nuclear Sciences, 1963, 13, 47.

129. PETROVIC, S., BEGAREVIC, A. et PETROVIC, J., B.B.A., 1965, 95, 518.

130. PHILPOT, J.St.L. et STANIER, J.E., B.J., 1956, 63, 214.

131. POGO, A.J., POGO, B.G.T., LITTAU, V.C., MIRSKY, A.E., HAMILTON, M.G., B.B.A., 1962, 55, 849.

132. POTTER, V.R., ELVEJHEM, C.A., J.B.C., 1936, 114, 495.

133. PREISS, J. et HANDLER, P., J.B.C., 1958, 233, 488.

134. PRESCOTT, D.M., Exp. Cell Res., 1960, 19, 29.

135. PUVION, E., DEFERT-KOBUS, M., KERCKAERT, J.P., PUVION-DUTILLEUL, F., SEGARD, E. et MONTREUIL, J., C. R. Acad. Sc., 1968, 266, n°3, 278.

136. RAKE, A.V. et GRAHAM, A.F., Biophys. J., 1964, 4, 267.

137. REES, K.R. et ROWLAND, G.F., B.J., 1961, 78, 89.

138. REES, K.R., HAZEL, F.R. et ROWLAND, G.F., B.J., 1962, 83, 523.

139. REES, K.R., ROWLAND, G.F. et VARCOE, J.S., B.J., 1963, 86, 130.

140. REICH, E., FRANKLIN, R.M., SHATKIN, A.J., TATUM, E.L., PNAS, 1962, 48, 1238.

141. RENDI, R., Exp. Cell Res., 1960, 19, 489.

142. REVEL, M., WINTZERITH, M., KLEIN-PETE, N. et MANDEL, P., Bull. Soc. Chimie Biol., 1961, 43, 91.

143. REVEL, M. et MANDEL, P., Cancer Res., 1962, 22, 456.

144. REVEL, M., Thèse de Doctorat ès-Sciences, 1963, Strasbourg.

145. RICCI, C. et IVALDI, G., Bull. Soc. Chimie Biol., 1958, 40, 1163.

146. RISTOW, H. et KÖHLER, K., B.B.A., 1966, 123, 265.

147. ROTH, J.S., J.B.C., 1958, 231, 1085.

148. SAMARINA, O.P., ZBARSKII, I.B., Biokhimiya, 1964, 29, 277.

149. SAMARINA, O.P., KRICHEVSKAYA, A.A. et GEORGIEV, G.P., Nature, 1966, 210, 1319.

150. SAMARINA, O.P., MOLNAR, J., LUKANIDIN, E.M., BRUSKOV, V.I., KRICHEVSKAYA, A.A. et GEORGIEV, G.P., J.M.B., 1967, 27, 187.

151. SAMARINA, O.P., LUKANIDIN, E.M. et GEORGIEV, G.P., B.B.A., 1967, 142, 561.

152. SCHERRER, K., LATHAM, H., DARNELL, J.E., PNAS, 1963, 49, 240.

153. SCHERRER, K. et DARNELL, J.E., B.B.R.C., 1962, 7, 486.

154. SCHERRER, K. et MARCAUD, L., Bull. Soc. Chimie Biol., 1965, 47, 1697.

155. SCHMIDT, G. et TANNHAUSER, S.J., J.B.C., 1945, 161, 83.

156. SCHNEIDER, J.H., J.B.C., 1959, 234, 2728.

157. SCHNEIDER, R.M. et PETERMAN, M.L., Cancer Res., 1950, 10, 751.

158. SCHOLTISSEK, S. et POTTER, V.R., Z. Naturforsch., 1960, 15b, 453.

159. SCHOLTISSEK, Ch., Nature, 1962, 194, 353.

160. SEED, R.W. et GOLDBERG, I.H., PNAS, 1963, 50, 275.

161. SEED, J., DNA and RNA synth. in Cell Cultures, in cells and tissues in culture, Pub. E.N. Willmer, N.Y. Ac. Press.

162. SHEARER, R.W. et Mc CARTHY, B.J., Biochem., 1967, 6, 283.

163. SHUSTER, L. et GOLDIN, A., J.B.C., 1958, 230, 873.

164. SIEBERT, G. et HUMPHREY, G.B., Advances in Enzymology, 1965, 27, 246.

165. SIEBERT, G., VILLALOBOS, J., RO, T.S., STEELE, W.J., LINDENMAYER, G., ADAMS, H. et BUSCH, H., J.B.C.,

1966, 241, 71.

166. SIMLER, S., POPOVIC, D. et MANDEL, P., Bull. Soc. Chimie, Biol., 1967, 49, 1509.

166a. SIMLER, S., POPOVIC., D., et MANDEL, non publié.

167. SINGH, V.N., RAGHUPATHY, E. et CHAIKOFF, I.L., B.B.A., 1965, 103, 623.

168. SOEIRO, R., VAUGHAN, H. et DARNELL, J.E., The Journal of Cell Biology, 1968, 36, 91.

169. SPIEGELMAN, S., GILBERT, C., KURLAND, G., RISEBROUGH, R.W. et WATSON, J.D., Nature, 1961, 190, 581.

170. SPIRIN, A.S. et NEMER, N., Science, 1965, 150, 214.

171. SRIPATI, C., SZAFARZ, D. et KHOUVINE, Y., C.R.Acad. Sc., 1962, 254, 1344.

172. STEVENS, B.J. et SWIFT, H., J.B.B.C., 1966, 31, 55.

173. STONEBURG, C.A., J.B.C., 1939, 129, 189.

174. SUGANO, H., WATANABE, I., OGATA, K., The Journal of Biochem., 1967, 61, 778.

175. TAMAOKI, T. et MUELLER, G.C., B.B.R.C., 1962, 9, 451.

176. TAMAOKI, T., J.M.B., 1966, 15, 624.

177. TISSIERES, A. et WATSON, J.D., Nature, 1958, 182, 778.

178. TISSIERES, A., Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biol., 1961, 26, 122.

179. TRAUB, A., KAUFMANN, E., GINZBURG-TIETZ, Y., Exp. Cell Res., 1964, 34, 371.

180. T'SO, P.O.P., BONNER, J. et VINOGRAD, J., B.B.A., 1958, 30, 570.

181. WAKSMAN, S.A. et WOODRUFF, H.B., Proc. Soc. Exptl Biol. Med., 1940, 45, 609.

182. WANG, T.Y., B.B.A., 1964, 87, 141.

183. WARNER, J.R., KNOPF, P.M. et RICH, A., PNAS, 1963, 49, 122.

184. WARNER, J.R., SOEIRO, R., BIRNBOIM, H.C., GIRARD, M. et DARNELL, J.E., J.M.B., 1966, 19, 349.

185. WATSON, M.L., J. Biophys. Biochem. Cytol., 1955, 1, 257.

186. WATSON, M.L., J. Biophys. and Biochem. Cyt., 1959, 6, 147.

187. WATSON, J.D., Bull. Soc. Chim. Biol., 1964, 46, 1399.

188. WEISS, S.B., PNAS, 1960, 46, 1020.

189. WETTSTEIN, F.O., STAEHELIN, T. et NOLL, H., Nature, 1963, 197, 430.

190. WILSON, S.H. et HOAGLAND, M.B., PNAS, 1965, 54, 600.

191. WINCKELMANS, D., HILL, M., ERRERA, M., B.B.A., 1964, 80, 52.

192. WINTZERITH, M., KLEIN-PETE, N., LIPOVSKI-DE LAPPARENT, I., MANDEL, L. et MANDEL, P., C. R. Acad. Sc. Paris, 1963, 257, 3690.

193. WINTZERITH, M., Thèse de Doctorat ès-Sciences, 1965, Strasbourg.

194. YANKOFSKY, S. et SPIEGELMAN, S., PNAS, 1962, 48, 1069.

195. YOSHIKAWA-FUKADA, M., FUKADA, T. et KAWADE, Y., B.B.A., 1965, 103, 383.

196. ZALTA, J.P., ROSENCZWAIJG, R., CARCASSO, N. et FAVARD, M. P., C. R. Acad. Sc. Paris, 1962, 255, 412.

197. ZLIBAY, G., B.B.A., 1959, 32, 233.

Vu, Strasbourg, le 20 Juin 1968
Le Président du Jury,
P. METAIS

Vu et approuvé :
Strasbourg, le 26 Juin 1968
Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,
M. HASSELMANN

Vu et permis d'imprimer :
Strasbourg, le 26 juin 1968.
Pr. le Recteur de l'Académie
Président du Conseil de l'Université

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie
M. HASSELMANN